

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Renaturation in vitro et cristallisation d'une protéine membranaire en tonneaux beta, l'Omp2a de *Brucella melitensis*, en vue de sa caractérisation structurale

Roussel, Guillaume

*Award date:*  
2010

*Awarding institution:*  
Université de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTÉS UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR**

**Faculté des Sciences**

**Renaturation *in vitro* et cristallisation d'une protéine membranaire  
en tonneaux  $\beta$ , l'Omp2a de *Brucella melitensis*, en vue de sa caractérisation  
structurale**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Guillaume ROUSSEL

Janvier 2010

## **Renaturation *in vitro* et cristallisation d'une protéine membranaire en tonneaux $\beta$ , l'Omp2a de *Brucella melitensis*, en vue de sa caractérisation structurale**

ROUSSEL Guillaume

### Résumé

Il existe, au sein des membranes, une classe de protéines particulières dites « membranaires ». Au sein d'un génome, celles-ci représentent approximativement 25% des séquences codantes, mettant en évidence leur importance. Les protéines membranaires sont ancrées dans la membrane et ont pour caractéristique d'être riche en segments hydrophobes, rendant ces protéines insolubles. Cette particularité rend l'étude de ces dernières complexe et difficiles. La connaissance de la structure tridimensionnelle d'une protéine membranaire permettrait d'en comprendre les relations structures/fonctions.

Au cours de ce travail, l'Omp2a de *Brucella melitensis* (Gram-négative), une porine en tonneaux  $\beta$ , a été étudiée et caractérisée en vue de déterminer sa structure tridimensionnelle par diffraction de rayons X. Dans ce cadre, l'Omp2a a été, dans un premier temps, surproduite en corps d'inclusion sous une forme non-native et purifiée par chromatographie échangeuse d'anions. Dans un second temps, la porine a été renaturée en utilisant soit un détergent non-ionique (le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside, DDM), soit un système récent et original associant le sodium dodecyl sulfate (SDS, détergent dénaturant) et un cosolvant, le 2-méthyl-2,4-pentanediol (MPD). Après renaturation, différentes espèces sont observées sur gel SDS/PAGE correspondant, selon notre hypothèse, aux monomères, monomères renaturés et trimères. Dans l'objectif de pouvoir les étudier, nous avons tenté de les isoler par tamis moléculaire et par extraction sur gel SDS/PAGE. Dans un troisième temps, les différents partenaires obtenus à la suite de la renaturation ont été caractérisés par tamis moléculaire afin de déterminer leur poids moléculaires respectifs. Finalement, des essais de cristallogenèse ont été réalisés sur l'Omp2a renaturée (au DDM ou au SDS/MPD)

## **Remerciements**

*En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce mémoire.*

*Tout d'abord, les professeurs J. Wouters et X. De Bolle pour m'avoir accueilli au sein de leur laboratoire respectif et avoir tout mis en œuvre pour que cette année se passe dans les meilleures conditions possibles.*

*La première partie de mon mémoire m'a permis de travailler en URBM. Je remercie M. De Bolle, premier promoteur de ce mémoire, qui a toujours été présent pour répondre à mes questions. Ensuite, les autres membres de l'URBM dont Aurélie Mayard qui m'a fait découvrir le laboratoire.*

*La seconde partie de mon mémoire m'a conduit au CBS, laboratoire que je n'avais jamais eu l'occasion de découvrir. Je remercie donc toute l'équipe d'avoir si bien accueilli un autre biologiste :*

*Monsieur Wouters, second promoteur de ce mémoire, pour l'aide et le temps qu'il a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.*

*Catherine Michaux, qui a rendu ce mémoire possible en le supervisant et en me suivant pas à pas. Merci à elle pour sa patience, de sa disponibilité et sa confiance.*

*Tous les autres membres du laboratoire CBS, Jenny, Caroline, Christine, Pierre, Jérémy, Laurence, Maureen, Julie et les autres mémorants, pour leur accueil, leur soutien et leurs conseils avisés.*

*Merci d'avance aux membres du Jury : Isabelle Housen, Soumya Pastoret, Johan Messiaen et Xavier De Bolle pour le temps qu'ils consacreront à la lecture de ce manuscrit.*

*Enfin, je ne pourrais m'arrêter ici sans remercier ma famille pour m'avoir épaulé, conseillé et suivi tout au long de mes études ainsi que d'avoir toujours cru en moi.*

*Guillaume Roussel*

# Table des matières

<b>A. Introduction .....</b>	<b>4</b>
1. Les protéines membranaires.....	5
1.1. La bicouche lipidique .....	5
1.2. Défi majeur .....	5
1.3. Classification des protéines membranaires .....	5
2. Les porines .....	6
2.1. Structure générale .....	6
2.2. Classification .....	7
2.3. Les porines des bactéries Gram-négative .....	7
2.3.1. La membrane externe des bactéries Gram-négative.....	7
2.3.2. Biogenèse des porines de la membrane externe <i>in vivo</i> : .....	8
3. Porines de <i>Brucella melitensis</i> : Omp2a et Omp2b .....	8
4. Etude des protéines membranaires .....	9
4.1. Utilisation de détergents .....	10
4.1.1. Caractéristiques des détergents.....	10
4.1.2. Classification des détergents.....	11
4.2. Renaturation <i>in vitro</i> .....	11
4.3. Cristallisation de protéines membranaires .....	12
<b>B. Objectifs et stratégies .....</b>	<b>14</b>
<b>C. Résultats et discussions .....</b>	<b>16</b>
1. Production et purification d'Omp2a. ....	17
1.1. Surproduction d'Omp2a en corps d'inclusion.....	17
1.2. Purification par chromatographie échangeuse d'anions. ....	17
2. Renaturation de l'Omp2a. ....	17
2.1. Renaturation par le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside.....	17
2.1.1. Optimisation de la température et du temps de renaturation. ....	18
2.1.2. Optimisation de la concentration en protéines.....	18
2.2. Renaturation par le système SDS/MPD.....	19
2.2.1. Mise au point du ratio SDS/MPD.....	19
2.2.2. Essais SDS/Alcool : cas de l'éthanol et du méthanol.....	19
2.2.3. Optimisation de la température et du temps de renaturation. ....	20
2.2.4. Optimisation de la concentration en NaCl. ....	20
2.2.5. Optimisation du temps de renaturation et de la concentration en protéines. .	21

---

3. Essais de séparation des différentes formes protéiques.....	21
3.1. Tamis moléculaire.....	21
3.2. Extraction sur gel SDS/PAGE.....	23
4. Cristallisation de l'Omp2a.....	24
4.1. Etape de concentration.....	24
4.2. Cristallogenèse.....	25
4.2.1. Omp2a renaturée par le DDM.....	25
4.2.2. Omp2a renaturée par le SDS/MPD.....	26
<b>D. Conclusions et perspectives.....</b>	<b>27</b>
<b>E. Matériel et méthodes.....</b>	<b>31</b>
1. Techniques relatives aux bactéries.....	32
1.1. Surexpression protéique par culture bactérienne.....	32
1.2. Lyse bactérienne et lavage des corps d'inclusion.....	32
2. Techniques relatives aux protéines.....	33
2.1. Purification des corps d'inclusion par chromatographie échangeuse d'ions....	33
2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS/PAGE).....	33
2.3. Coloration au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent.....	34
2.4. Suivi de la renaturation.....	35
2.5. Renaturation des protéines.....	35
2.5.1. Via n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside.....	35
2.5.2. Via SDS/MPD.....	35
2.6. Chromatographie d'exclusion : tamis moléculaire.....	36
2.7. Extraction sur gel.....	36
2.7.1. Marquage aux fluorochromes.....	37
2.7.2. Extraction par diffusion.....	37
3. Techniques relatives à la cristallogenèse.....	37
3.1. Concentration des protéines.....	37
3.2. Cristallogenèse.....	37
3.2.1. Technique de la goutte suspendue.....	38
3.2.2. Technique de la goutte assise.....	38
<b>F. Références bibliographiques.....</b>	<b>39</b>

# A. Introduction



# 1. Les protéines membranaires

## 1.1. La bicouche lipidique

Les membranes cellulaires se composent principalement de lipides dont les plus abondants sont les phosphoglycérides ou phosphoglycérolipides. Un phosphoglycéride est une molécule amphipatique, c'est-à-dire qu'elle comprend une partie hydrophile et une autre hydrophobe. La structure des phosphoglycérides est proche des graisses : un glycérol portant deux chaînes d'acides gras et un groupement phosphate porteur de charges négatives (**figure 1 A**). Des petites molécules additionnelles (sérine, éthanolamine, choline, ...), habituellement chargées ou polaires, peuvent se lier au groupement phosphate et former différents phosphoglycérides.

A la surface d'une cellule, les phosphoglycérides sont disposés en une double couche constituant la membrane (**figure 1 B**). Les queues hydrophobes se font face et pointent vers l'intérieur de la membrane, leur permettant d'éviter les contacts avec l'eau. Les têtes hydrophiles sont en contact avec le milieu extérieur de part et d'autre de la membrane formée. Toutefois, une membrane n'est pas seulement composée de lipides, mais également de protéines dites membranaires.

## 1.2. Défi majeur

La quantité de gènes codant pour les protéines membranaires est estimée à environ 25% du génome des organismes<sup>1</sup>. Ce nombre important reflète l'importance de cette classe de protéines et est expliqué par les diverses fonctions assurées telles que des activités enzymatiques, des fonctions structurales, des transporteurs, la réception et transmission de signaux, l'adhésion entre cellules, ...

Les protéines membranaires sont ancrées aux membranes et ont pour caractéristique d'être riches en segments hydrophobes<sup>2</sup>. Cette particularité rend l'étude de ces dernières complexe et difficile. En effet, les protéines membranaires étant insolubles dans l'eau, les techniques habituelles utilisées pour caractériser les protéines ne sont pas applicables. Or, pour comprendre leurs activités et fonctions, il est essentiel de connaître leur structure. En 1985, la structure tridimensionnelle du centre de réaction photosynthétique de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis* fut publiée<sup>3</sup>. Il s'agissait de la première structure d'une protéine membranaire révélée, bien après les protéines solubles (Lysozyme, 1965<sup>4</sup>). En 2009, la Protein Data Bank (PDB) nous révèle que sur approximativement 50.000 structures publiées, moins de 1% sont de protéines membranaires, preuve de leur complexité. Les structures de ces dernières sont reprises dans une banque de donnée qui leur est propre : « Membrane protein data bank (MPDB<sup>5</sup>) ». Celle-ci répertorie actuellement 1005 structures de 259 protéines différentes (Chiffres Novembre 2009). La **figure 2** représente l'évolution du nombre de structures connues.

## 1.3. Classification des protéines membranaires

Les protéines membranaires peuvent être classées de deux manières (**figure 3**):

1. Selon un classement topologique, on distingue les protéines polytopiques, ou transmembranaires, des protéines monotopiques. Les protéines polytopiques ont pour caractéristique d'être en contact avec les deux compartiments formés par la membrane et donc de la traverser comme représenté sur la **figure 3 A**. Par opposition, les

protéines monotopiques ne sont en contact qu'avec l'un des deux compartiments créés par la membrane (**figure 3 B-C-D**).

2. Selon un classement biochimique, on distingue les protéines membranaires intrinsèques (ou intégrales) et les extrinsèques (ou périphériques). Cette distinction se fait selon la méthode d'extraction de la membrane. En effet, les protéines intrinsèques sont insérées en membrane et l'utilisation de détergents est nécessaire à leur extraction (**figure 3 A-B**), ce qui n'est pas le cas des protéines extrinsèques (**figure 3 C-D**) simplement en contact avec la bicouche lipidique. Ces dernières peuvent être soit en interaction indirecte avec la membrane par le biais d'une autre protéine (**figure 3C**), soit en contact direct (**figure 3 D**).

Parmi les protéines polytopiques ou intrinsèques, on observe des structures amphipatiques telles que des hélices  $\alpha$  ou des feuilletts  $\beta$ .

Dans le cas de protéines monotopiques ou extrinsèques, différentes structures peuvent être observées<sup>6</sup> : (i) Les protéines monotopiques sont partiellement insérées en membrane soit par une hélice  $\alpha$  amphipatique placée horizontalement dans la membrane soit par des boucles hydrophobes s'intégrant dans la membrane. (ii) Les protéines ne sont pas insérées en membrane. Elles peuvent donc interagir avec une autre protéine par des domaines compatibles, ou en interagissant de manière électrostatique avec les lipides membranaires.

## 2. Les porines

### 2.1. Structure générale

Les protéines transmembranaires ayant une structure en tonneau  $\beta$  assurent différentes fonctions au sein des membranes<sup>7</sup> : enzymes, récepteurs, transporteurs, ... Au cours de ce travail, nous nous sommes intéressés à la classe des porines. Les porines sont localisées dans les membranes externes des bactéries Gram-négatives, des chloroplastes et des mitochondries.

Actuellement, seule une vingtaine de structures de protéines transmembranaires en tonneaux  $\beta$  ont été révélées et leur étude a permis d'établir quelques caractéristiques générales. Une structure tridimensionnelle de porine est représentée à la **figure 4**<sup>8</sup>. Les extrémités N- et C-terminales sont habituellement localisées au niveau de l'espace périplasmique<sup>9</sup>. Les brins  $\beta$  sont inclinés selon un axe approximatif de  $45^\circ$ <sup>10</sup>, ils sont habituellement constitués de 11 résidus (**figure 4 A**) et sont disposés de manière antiparallèle entre eux. Des boucles assurent la connexion entre les brins  $\beta$ . Celles-ci sont courtes au niveau de l'espace périplasmique et longues du côté du milieu extérieur (**figure 4 B**). Généralement, la boucle L3 (située entre les brins  $\beta$  6 et 7) a tendance à se replier à l'intérieur du pore, stabilisant ainsi le tonneau  $\beta$ <sup>11</sup> (**figure 4 C**) et joue un rôle de filtre en diminuant le diamètre du pore. En fonction du nombre de résidus impliqués dans la boucle, le pore sera plus ou moins étroit.

Environ 60% des porines connues ont une structure trimérique<sup>12</sup>. Sous cette forme, les extrémités N- et C- terminales ont pour particularité de se replier ensemble au niveau des interfaces entre les monomères dans la région de l'axe de trimérisation<sup>13</sup> et contribuent à la stabilisation de l'édifice en réalisant des ponts salins (**figure 4 D**). Une autre caractéristique des porines est la capacité qu'ont les monomères à s'imbriquer les uns dans les autres. Dans ce cas, certaines boucles se replient, non pas sur le monomère dont elles sont issues, mais sur le monomère voisin. Cette structure expliquerait la stabilité exceptionnelle des porines trimériques et leur résistance aux hautes températures<sup>14</sup>.

## 2.2. Classification

Les porines peuvent être classées en deux groupes : (i) La majorité des porines est dite de « diffusion générale<sup>15,16</sup> ». La fonction de ces porines est la diffusion de petits métabolites hydrophiles en suivant les règles de l'osmose. Les métabolites passeront du compartiment le plus concentré vers le compartiment le moins concentré. Dans le cas d'une membrane cellulaire, ceux-ci passeront du milieu extérieur plus concentré vers l'intérieur de la cellule tandis que les déchets produits par la bactérie se déplaceront de l'intérieur de la cellule où ils sont produits vers le milieu extérieur. Des études ont permis de connaître la limite d'exclusion des porines en mesurant le transport de différents sucres au travers de liposomes<sup>17</sup> et une valeur seuil de 600 Da a été mise en évidence chez *Escherichia coli*<sup>18, 19</sup>. Cette limite implique que les ions, les acides aminés et les sucres de faible poids moléculaires sont capables de passer au travers de la membrane externe sans aucun autre contrôle que la différence de concentration, tandis que les molécules de plus haut poids moléculaire doivent transiter par le biais de récepteurs spécifiques. De plus, il a été mis en évidence que les porines avaient une affinité plus élevée pour les cations. Typiquement, le rapport de perméabilité cation/anion est de l'ordre de 1 à 4, reflétant une perméabilité plus élevée pour les cations. De part leur fonction, ces porines de diffusion générale se trouvent en un grand nombre de copie au sein de la membrane externe. D'un point de vue régulation, ces porines montrent une fermeture des pores contrôlée par une variation de potentiel électrique<sup>20</sup>. Au niveau de leur structure, les porines de diffusion générale existent sous la forme de trimères<sup>21</sup>. (ii) En opposition aux porines de diffusion générale, il existe des porines dites « spécifiques » ayant une structure monomérique<sup>22</sup>. Celles-ci possèdent un site de liaison spécifique à certaines classes de molécules. De plus, on remarque que ces porines sont préférentiellement exprimées dans certaines conditions et se retrouvent donc habituellement en un faible nombre de copies en membrane. De manière générale, ces protéines fonctionnent en utilisant l'énergie métabolique ; ainsi on observe fréquemment des systèmes additionnels aux porines utilisant des phosphotransférases ou des transporteurs ATP-binding cassette<sup>23,24</sup>. Une caractéristique des porines spécifiques est la saturation. En effet, le transport du substrat suit une courbe de Michaelis-Menten, et l'excès de substrat entraîne la saturation du transporteur observable par une accumulation du substrat.

## 2.3. Les porines des bactéries Gram-négative

### 2.3.1. La membrane externe des bactéries Gram-négative

L'enveloppe des bactéries Gram-négative est constituée de deux membranes : l'interne (IM pour inner membrane) et l'externe (OM pour outer membrane). Elles délimitent l'espace périplasmique contenant la couche de peptidoglycan qui, ensemble, constituent l'enveloppe bactérienne (**figure 5**). Alors que la membrane interne est une membrane conventionnelle constituée d'une bicouche de phospholipides, la membrane externe a une composition particulière dite asymétrique de par la constitution de chaque feuillet : le feuillet interne, faisant face au périplasma, est formé de phospholipides classiques (80% phosphatidylethanolamine, 15% phosphatidylglycérol et 5% cardiolipine) tandis que le feuillet externe, faisant face au milieu extérieur, est constitué de phospholipides et de lipopolysaccharide (LPS). Typiquement, une molécule de LPS est formée de trois éléments<sup>25</sup> : (i) le lipide A, un phospholipide basé sur un noyau glucosamine ; (ii) un noyau oligosaccharidique et (iii) un polysaccharide distal formant l'antigène O immunogénique.

Le lipide A a pour particularité d'être constitué de 6 chaînes d'acides gras saturées (par opposition aux deux chaînes d'acides gras saturées ou non des phospholipides

conventionnels). Celle-ci déteint sur la membrane externe en augmentant son hydrophobicité due aux fortes interactions entre les molécules de LPS.

De par sa constitution, la membrane externe joue un rôle de barrière sélective afin de protéger la bactérie face aux composés externes, l'exemple le plus représentatif étant les antibiotiques. Contrairement à la membrane interne, la membrane externe ne possède pas de gradient de protons et l'ATP n'est pas présent au sein du périplasma. N'ayant donc aucune source d'énergie à sa disposition, la membrane externe ne permet que la diffusion passive. Les nutriments et autres molécules franchissent donc cette membrane selon leurs différences de concentrations respectives et seules les porines de diffusion générale permettent ce passage.

### 2.3.2. Biogenèse des porines de la membrane externe *in vivo* :

Les protéines exprimées en membranes externes sont, comme toutes les autres protéines, produites dans le cytosol et doivent donc traverser la membrane interne et s'insérer dans la membrane externe pour assurer leurs fonctions. Des mécanismes aidant ces passages sont proposés (**figure 6**<sup>26</sup>). Les protéines de la membrane externe ou OMPs (pour outer membrane protein) sont synthétisées dans le cytoplasme sous forme de précurseurs possédant à leur extrémité N-terminale une séquence d'insertion en membrane : le peptide signal (SP). Ces précurseurs sont ensuite liés par une chaperonne, SecB, dont les rôles sont d'éviter l'agrégation des OMPs dans le cytoplasme et de maintenir celles-ci dans une conformation dite « translocation-compétente ». Lorsque le précurseur est lié, SecB induit une translocation à travers la machinerie Sec intégrée en membrane interne<sup>27</sup>. Le précurseur d'OMP se trouve donc dans l'espace périplasmique où le peptide signal est clivé. Deux chaperonnes prennent ensuite le relais : Skp et SurA.

Skp est une petite protéine de 14 kDa qui lie spécifiquement les protéines non-natives<sup>28</sup> dès leur passage à travers la machinerie Sec et facilite leur passage. Lorsque le précurseur d'OMP est complètement extrait de la machinerie Sec, celui-ci est lié à Skp et se trouve sous la forme d'un intermédiaire périplasmique soluble<sup>29</sup> évitant ainsi l'agrégation au sein du périplasma.

SurA est une protéine de 46 kDa fonctionnant comme une chaperonne qui assiste la renaturation de l'OMP<sup>30</sup>. Des études de liaison montrent que SurA a une haute affinité pour les peptides riches en résidus aromatiques (particulièrement lorsque deux résidus se suivent dans la séquence), typiques des séquences des protéines transmembranaires en tonneau  $\beta$ <sup>31</sup>. Lors de la liaison du précurseur d'OMP, SurA subit un changement de conformation qui induit une affinité pour le complexe BAM (pour  $\beta$ -barrel assembly machinery) inséré en membrane externe. La machinerie BAM est constituée de 5 sous-unités (A-E). BAM A (ou Omp85), la principale sous-unité, constitue un pore<sup>32</sup> au sein de la membrane externe permettant le passage de l'OMP native tandis que les quatre autres sous-unités (B-E) sont des lipoprotéines monotopiques aidant à la translocation<sup>33</sup> et jouant un rôle dans l'ancrage de BAM A.

## 3. Porines de *Brucella melitensis* : Omp2a et Omp2b

Il y a une vingtaine d'années<sup>34</sup>, deux gènes ont été identifiés comme codant pour des porines de la membrane externe de *Brucella abortus* : *omp2a* et *omp2b*. Ceux-ci sont séparés par une distance de 830 paires de base et orientés de manière opposée (**figure 7**<sup>35</sup>). Ceux-ci codent pour des porines d'une masse approximative de 36-38 kDa : Omp2a et Omp2b respectivement. Lors de cultures de *Brucella abortus* sans condition particulière, seule l'Omp2b est exprimée<sup>36</sup> et identifiée. La porine Omp2a n'est produite qu'artificiellement,

lorsque le promoteur de la région intergénique est inversé. Dans *E. coli*, il est possible d'exprimer artificiellement les deux porines (Omp2a et Omp2b) et d'observer l'insertion en membrane externe<sup>37</sup>. Toutefois, seule l'insertion de la porine Omp2a semble augmenter la perméabilité de la membrane externe d'*E. coli*.

Introduction  
pore plus large que l'Omp2b. Ceci expliquerait les rôles différents de ces porines. L'Omp2b serait exprimée de manière constitutive, permettant l'entrée de molécules hydrophiles dans l'espace périplasmique. En cas de diminution de l'apport en nutriment (typiquement au sein du phagosome), un remaniement génétique induirait l'expression de l'Omp2a qui permettrait une entrée correcte de nutriments.

Il existe des outils de modélisation topologique, développés dans le but d'anticiper certaines structures secondaires et tertiaires en l'absence d'une structure tridimensionnelle expérimentale. Appliquées au monomère d'Omp2a, ces techniques ont prédit une structure en tonneau- $\beta$  à 16 brins<sup>38,39</sup>. La prédiction topologique de l'équipe de J.Y. Paquet<sup>39</sup> confirme les hypothèses de structure en tonneau  $\beta$  pour le monomère d'Omp2a et apporte des informations supplémentaires : le tonneau  $\beta$  serait constitué de 16 brins  $\beta$  antiparallèles transmembranaires reliés entre eux par 8 boucles de chaque côté de la membrane externe. Chaque boucle ayant une longueur allant de 5 à 29 résidus et sont nommées L1 à L8 (**figure 4 B**). Des études complémentaires ont permis d'établir que la boucle L5 serait à l'origine de la régulation de la perméabilité du pore puisque capable de se replier sur l'ouverture<sup>40</sup>. Cette observation fait de l'Omp2a un cas inhabituel et donc intéressant à étudier. En effet, comme énoncé précédemment, la boucle L3 est habituellement responsable de la régulation du diamètre du pore. En comparant la séquence de l'Omp2a et de l'Omp2b, on remarque une perte de 10 résidus au niveau de la boucle L5 de l'Omp2a. Cette perte de résidus implique une diminution du volume de cette boucle et donc la création d'un pore de plus grande taille lorsque cette boucle s'insérera dans le pore, ce qui expliquerait que l'Omp2a augmente plus la perméabilité d'une membrane lorsqu'elle y est insérée que l'Omp2b.

Douglas et son équipe<sup>41</sup> ont mis en évidence la possibilité pour chacune des deux porines de s'oligomériser sous forme de trimères. Toutefois, peu de choses sont connues concernant l'Omp2a : son poids moléculaire a été établi théoriquement selon sa séquence en acides aminés, et sa capacité à former des trimères a été proposée suite à des analyses informatiques basées également sur la séquence en acides aminés ainsi que des observations de distances de migration sur gel SDS/PAGE.

## 4. Etude des protéines membranaires

La première étape pour étudier et caractériser des protéines membranaires est de les obtenir en quantité. Dans ce contexte, il existe deux techniques : la surexpression en membrane et la surexpression en corps d'inclusion.

La surexpression en membrane a pour principe de favoriser l'expression native de la protéine d'intérêt. Un vecteur contenant le gène d'intérêt et une séquence d'insertion en membrane est cloné et inséré dans une bactérie. Une fois exprimée au niveau du cytoplasme, la protéine d'intérêt sera dirigée à travers la membrane interne, renaturée et insérée en membrane externe (comme expliqué précédemment). Des techniques de purification sont ensuite mises au point afin d'extraire spécifiquement les protéines des membranes. Cette méthode de surexpression en membrane est pourtant peu utilisée dans le cas de porines. En effet, la présence massive de ces protéines au sein de la cellule n'est pas sans conséquences. Premièrement, la quantité de précurseurs d'OMP est telle que les systèmes de translocation à travers les membranes sont rapidement saturés. Il en découle une agrégation de précurseurs au sein du cytoplasme ainsi

qu'une utilisation du système de translocation axée sur la protéine d'intérêt au détriment des autres protéines membranaires. De plus, l'insertion massive de porines au sein de la membrane externe peut causer des effets cytotoxiques<sup>42</sup>.

La surexpression en corps d'inclusion permet de faire face à ces problèmes. Les corps d'inclusion sont, en effet, non cytotoxiques pour la cellule et protègent les protéines de la protéolyse<sup>43</sup>. Ceux-ci sont des agrégats denses de protéines non-natives. Afin d'obtenir ce résultat, le gène codant pour la protéine d'intérêt est dépourvu d'une séquence d'insertion en membrane ce qui mène à l'accumulation du précurseur au sein du cytoplasme. La densité des agrégats étant élevée, il est possible de les séparer des déchets cellulaires par centrifugation<sup>44</sup>. Mis à part quelques contaminants tels que l'ADN, des ribosomes ou quelques protéines bactériennes, les corps d'inclusion sont exclusivement constitués de la protéine d'intérêt<sup>45</sup> (en moyenne 95%<sup>46</sup>). L'agrégation des protéines sous cette forme est due aux interactions intramoléculaires, principalement les interactions hydrophobes<sup>47</sup>. Le principal désavantage de cette technique est d'obtenir la protéine d'intérêt sous sa forme dénaturée, la difficulté étant de parvenir à retrouver la forme native.

## 4.1. Utilisation de détergents

Dans la littérature, plusieurs exemples montrent la faisabilité de renaturer des tonneaux  $\beta$  en utilisant des détergents (Figure 8<sup>48</sup>).

### 4.1.1. Caractéristiques des détergents.

Les détergents sont des molécules amphipatiques, c'est-à-dire qu'ils possèdent une tête polaire (hydrophile) à l'une de leur extrémité et une queue apolaire (hydrophobe) à l'autre extrémité. De par cette dualité, les détergents possèdent les mêmes propriétés que les lipides formant les membranes. Il est donc possible de mimer les propriétés de la bicouche membranaire en utilisant judicieusement les détergents. Les queues hydrophobes des molécules de détergents ont tendance à se rassembler en sphères, appelées micelles, afin de minimiser les interactions avec les molécules d'eau en solution. Les micelles sont caractérisées par le nombre de molécules de détergent les formant, appelé « nombre d'agrégation ». Les détergents sont également définis par la concentration en détergent à partir de laquelle les micelles se formeront, appelée concentration micellaire critique (ou CMC). Celle-ci varie selon<sup>49</sup> :

- La longueur de la chaîne hydrophobe. Plus celle-ci est longue, plus la CMC est petite et inversement. De plus, l'insertion de doubles liaisons dans la chaîne hydrophobe a tendance à faire augmenter la CMC.
- La température. Les détergents ont tendance à devenir insolubles lorsque la température diminue. Une forme cristalline du détergent apparaît en équilibre avec une infime proportion de monomères solubles. Une diminution de la température tend à augmenter la CMC.
- La force ionique du milieu. La tête polaire du détergent peut se lier à un contre-ion, ce qui aura pour effet de modifier le comportement du monomère. L'augmentation de la concentration en contre-ion a donc tendance à faire augmenter la CMC.

La capacité à mimer les propriétés des membranes *in vivo* est donc utilisée pour renaturer des protéines membranaires *in vitro*. Dans ce cas, les zones hydrophobes habituellement transmembranaires sont masquées par les détergents (figure 9).

### 4.1.2. Classification des détergents

Les détergents sont classifiés en 4 catégories (**figure 10<sup>50</sup>**) :

1. Les détergents ioniques. Ils possèdent une tête polaire portant une charge nette positive ou négative et peuvent donc être cationiques ou anioniques. La CMC d'un détergent ionique est définie en fonction de l'effet combiné des forces répulsives de la tête ionique et des contacts hydrophobes des hydrocarbures. Un exemple de détergent ionique est le Sodium dodecyl sulfate (SDS) (**figure 10 A**). Ce détergent est principalement utilisé pour la solubilisation de corps d'inclusion de protéines. Le SDS porte une charge nette négative qui en fait un détergent dénaturant.
2. Les sels biliaires acides. Ces détergents sont également ioniques (cationiques ou anioniques). Par rapport aux détergents ioniques classiques, les sels biliaires acides possèdent un groupe hydrophobe rigide formé de cycles (**figure 10 B**).
3. Les détergents non-ioniques (**figure 10 C**). Leur tête hydrophile n'est pas chargée. L'hydrophilicité est due à la présence de nombreux groupements hydroxyles. Les détergents non-ioniques sont considérés comme « doux » et peu dénaturants. Ils ont en effet tendance à prioritairement rompre les interactions lipides-lipides et lipides-protéines avant les interactions protéines-protéines. Ce type de détergent est donc principalement utilisé pour renaturer des protéines. Un exemple est le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM) régulièrement utilisé pour l'étude de protéine membranaire intégrale<sup>51</sup>.
4. Les détergents zwitterioniques (**figure 10 D**). Ils combinent les propriétés des détergents ioniques et non-ioniques. Ils sont régulièrement utilisés pour les études structurales de protéines membranaires<sup>52</sup>.

### 4.2. Renaturation *in vitro*

Deux observations sont à la base des techniques de renaturation *in vitro* : (i) Henning et son équipe montrent qu'une protéine membranaire intégrale (OmpA) dénaturée retrouve sa conformation native lorsqu'elle est incubée en présence de LPS et d'un détergent, le triton X-100<sup>53</sup>. En parallèle, Dornmair et son équipe démontrent que la même protéine (OmpA) dénaturée en présence de grandes quantités de SDS retrouve sa structure native lorsqu'elle est incubée en présence d'un détergent doux, l'octylglucoside et en absence de LPS<sup>54</sup>. Les résultats de structures concordant, une théorie est née : puisqu'une même structure a été obtenue de deux manières différentes, l'information codant pour la structure d'une protéine est présente au sein même de la séquence en acides aminés. Cette théorie concorde avec des résultats préalables<sup>55</sup>.

Il existe plusieurs méthodes pour renaturer *in vitro* des protéines. Deux techniques sont principalement utilisées : (i) La première est basée sur la chromatographie d'exclusion de taille. En déposant les protéines solubilisées à partir des corps d'inclusion sur un tamis moléculaire, les agents dénaturants (principalement agents chaotropiques tels que l'urée et l'hypochloride de guanidium) sont directement élués. De plus, l'utilisation d'une matrice d'exclusion de taille adaptée permet de séparer les différents intervenants lors de la renaturation et ainsi minimiser les effets d'agrégation (l'agrégation de quelques protéines déclenche le phénomène à large échelle). Au cours du passage des protéines à travers la colonne et dans des conditions de renaturation, les protéines sont renaturées sur la colonne et peuvent s'associer en oligomères. Les oligomères ayant une masse moléculaire plus

importante, migreront plus lentement et se sépareront de la masse de protéines non-renaturées. Cette technique a un avantage principal : la séparation oligomère-monomère permet de déplacer un éventuel équilibre-monomère-oligomère vers la forme oligomérique<sup>56</sup>. (ii) La méthode de dilution. Cette méthode est plus largement utilisée. Le principe est simple : les protéines non-natives solubilisées sont directement diluées dans un tampon de renaturation. La dilution permet de rapidement diminuer la concentration en agent chaotrope, tel que l'urée ou la guanidine, en la ramenant à des valeurs considérées comme non-dénaturantes. Cette technique présente l'avantage d'être facilement applicable pour les petits volumes et donc pour les tests de mises au point. Typiquement, la protéine est diluée de deux à quinze fois dans un tampon contenant le détergent. La concentration optimale en détergent varie de 4 à 500 fois la CMC<sup>57</sup>. Généralement, le détergent est utilisé à une concentration approximative de 20 fois sa CMC. Au niveau du choix du détergent, seule l'expérience permet de connaître l'efficacité de chacun. De plus, la technique de dilution permet de maintenir, en fonction de son importance, une faible quantité d'agent chaotrope (inférieure à 4 M). Or, il a été démontré que la présence de molécules de faible poids moléculaire (tel que l'urée) dans le tampon de renaturation a un effet bénéfique<sup>58</sup> en stabilisant les intermédiaires<sup>59</sup>.

### 4.3. Cristallisation de protéines membranaires

Il existe trois méthodes expérimentales pour déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine: la spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (NMR), la microscopie électronique (EM) et la diffraction de rayons-X. Seule cette dernière permet de déterminer la structure tridimensionnelle d'une protéine à une résolution atomique (de l'ordre de l'angström, Å). Dans ce travail, nous tenterons de cristalliser l'Omp2a dans sa forme native afin d'obtenir sa structure.

La principale difficulté d'étudier des protéines membranaires intégrales est la présence de nombreuses régions hydrophobes en surface. Celles-ci rendent les essais de cristallogénèse difficiles par la tendance qu'on les zones hydrophobes à s'agréger. Plusieurs techniques permettent de minimiser ces effets hydrophobes : premièrement, des procédés de génie génétique permettent de rendre une protéine soluble<sup>60</sup>. Bien que ces procédés aient prouvés leur efficacité, ils ne sont pas transposables à toutes les protéines membranaires intégrales. Deuxièmement, il est également possible de mimer l'environnement de la couche lipidique par l'utilisation de détergents non-ioniques ou zwitterioniques, ceux-ci ayant prouvé leur efficacité dans la cristallisation de protéines membranaires intégrales.

Plusieurs techniques existent pour produire des cristaux de protéines membranaires : la technique *in surfo*, *in cubo* et l'utilisation de bicelles. La technique *in surfo*, utilisée sur notre Omp2a, consiste à incorporer la protéine dans des micelles de détergents<sup>61</sup>. Cette technique présente l'avantage d'être facile à mettre en œuvre. Les deux autres techniques consistent essentiellement à former un substitut de membrane dans le but de favoriser les interactions hydrophobes et d'ainsi favoriser la cristallisation.

Afin de cristalliser une protéine membranaire intégrale, il existe deux techniques : la diffusion de vapeur et la diffusion de liquide. Dans les deux cas, l'objectif est d'atteindre un état de saturation en protéines nécessaire à la nucléation et à la croissance cristalline. La formation du cristal est fonction de plusieurs paramètres. (i) Le premier est la taille des micelles et par conséquent le détergent utilisé. En effet, l'espèce qui précipite et forme le cristal est le complexe détergent-protéine. En solution, les détergents liés à la protéine sont disposés de manière à couvrir toutes les régions hydrophobes de la protéine. Dans le cas de protéines membranaires intégrales, cette région fait le tour de la protéine. Il n'est donc pas illogique



d'observer un anneau de détergent autour de la protéine (**figure 11**<sup>62</sup>). Cet anneau de détergent a déjà été observé sur l'OmpF d'*Escherichia coli*<sup>63</sup>. L'épaisseur de la couche de détergent autour d'une protéine est corrélée à la taille de micelles. Ainsi, au plus une micelle est grande, au plus l'épaisseur de détergent autour de la protéine est importante. Le problème de l'anneau de détergent est qu'il joue un rôle de barrière empêchant les interactions protéines-protéines nécessaires à la cristallisation. Afin d'optimiser la cristallogenèse, il est donc intéressant de travailler avec des détergents dont la taille des micelles est la plus petite possible. (ii) Le second paramètre est la pureté de l'échantillon. Plusieurs exemples illustrent celui-ci<sup>64</sup>. (iii) D'autres facteurs influencent la formation des cristaux : la température de cristallisation, du pH, des proportions en agents précipitant ou sels et du temps<sup>65</sup>.

Enfin, il est possible d'optimiser la formation d'un cristal au sein d'une condition connue en utilisant des additifs amphiphiles. Ceux-ci peuvent s'insérer au sein des détergents couvrant les zones hydrophobes des protéines membranaires. Cette insertion a pour effet de réduire la taille de l'anneau de détergent et d'ainsi augmenter la qualité du cristal<sup>66</sup>.

## B. Objectifs et stratégies

L'objectif général de ce projet est de déterminer les structures tridimensionnelles des porines Omp2a et Omp2b par diffraction de rayons X dans le but de comprendre leurs fonctions respectives ainsi que de pouvoir comparer leurs structures.

Dans le cadre de ce mémoire, nous avons focalisé notre attention sur l'Omp2a dans l'objectif de parvenir à la cristalliser (**figure 12**).

Pour ce faire, dans un premier temps, l'Omp2a sera surproduite en corps d'inclusion dans le but d'en obtenir une grande quantité. L'inconvénient de cette méthode est que la protéine est sous une forme dénaturée. Afin d'obtenir un échantillon protéique suffisamment pur pour les essais de cristallogénèse, celui-ci sera directement purifié en conditions dénaturantes.

Dans un second temps, nous tenterons de renaturer l'Omp2a par deux méthodes : en utilisant d'une part un détergent non-ionique, le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside ou DDM, et d'autre part un système récemment mis en évidence associant le sodium dodecyl sulfate et le 2-méthyl-2,4-pentanediol (SDS/MPD). Le rendement de chacune de ces méthodes de renaturation sera optimisé en jouant sur différents paramètres tels que la température et le temps de renaturation ainsi que les concentrations en protéines, sels et détergents impliquées. Sous sa forme native, l'Omp2a forme des trimères. Le but sera d'obtenir un échantillon exclusivement constitué de trimères pour les essais de cristallogénèse.

Dans un troisième temps, nous tenterons de cristalliser l'Omp2a renaturée soit par le DDM, soit par le système SDS/MPD. Dans le cas de la renaturation par le DDM, une condition de cristallisation a préalablement été mise en évidence. Les cristaux issus de cette condition étant trop petits que pour être utilisés en diffraction de rayons X, cette condition de cristallisation sera améliorée. Dans le cas de la renaturation par le système SDS/MPD, l'objectif sera d'identifier une ou plusieurs condition(s) de cristallisation.

Une fois les cristaux obtenus, ceux-ci seront analysés par diffraction de rayons X dans le but d'obtenir des spectres de diffraction permettant de déduire la structure cristallographique de l'Omp2a.

## C. Résultats et discussion

## 1. Production et purification d'Omp2a.

### 1.1. Surproduction d'Omp2a en corps d'inclusion.

La surproduction de l'Omp2a est possible en corps d'inclusion. Pour ce faire, une souche d'*Escherichia coli* a préalablement été transformée par un plasmide contenant le gène d'intérêt sans son peptide signal (voir matériel et méthode). Après les étapes de culture, lyse et de récupération des corps d'inclusion, différentes fractions ont été étalées sur gel SDS/PAGE 12% (**figure 13**).

Le résultat de la surproduction est observable au niveau du second puits où apparaît une bande intense correspondant au poids moléculaire d'un monomère de l'Omp2a (37 kDa). Lors de l'étape de lyse (puits n°3) et après centrifugation, des protéines de la cellule sont éliminées (se retrouvent dans le surnageant) ainsi qu'une faible quantité d'Omp2a (absence de la bande dans le surnageant). Les deux étapes de lavage (4-5) permettent d'éliminer les protéines bactériennes présentes dans les corps d'inclusion. Le dernier puits (6) montre le résultat de la solubilisation des corps d'inclusion dans l'urée, un agent chaotrope. On observe une majorité d'Omp2a et quelques bandes indésirables.

### 1.2. Purification par chromatographie échangeuse d'anions.

Avant de renaturer l'Omp2a, il est indispensable de purifier les corps d'inclusion solubilisés. La technique de purification appliquée ici est la chromatographie échangeuse d'anions (voir matériel et méthodes). Le point isoélectrique de l'Omp2a, déterminé théoriquement selon sa séquence en acides aminés, est de 4,27. En travaillant à pH 8, l'Omp2a est chargée négativement et peut donc s'accrocher à une colonne échangeuse d'anions et s'éluer à une concentration précise en contre-ions (NaCl). Le résultat de la purification est représenté à la **figure 14**.

L'élution d'Omp2a est assurée par un gradient où l'on augmente la concentration en NaCl (contre-ions) de 17 à 500 mM sur 25 ml. (**figure 14 A**). On observe que l'élution d'Omp2a est très étalée. Sur gel (**figure 14 B**), on observe une bande contaminante d'un poids moléculaire légèrement supérieur au poids de l'Omp2a. Pour éliminer cette bande, un second protocole a été mis en œuvre : la durée du gradient d'élution est doublée. Ainsi, on passe de 17 à 500 mM en NaCl sur 50 ml (au lieu de 25 ml). Le gradient étant plus lent, l'élution devrait être améliorée et la protéine contaminante devrait être éluée à un moment différent de l'Omp2a. Le résultat de ce second protocole d'élution se trouve à la **figure 14 C** où on observe le même type de profil de chromatogramme : seul un pic d'élution est observé. Toutefois, sur gel, on observe une meilleure séparation de la bande contaminante et de la bande correspondant à l'Omp2a. Ainsi, les échantillons issus des fractions 30 à 38 seront regroupés en un seul échantillon qui sera utilisé pour la suite.

## 2. Renaturation de l'Omp2a.

### 2.1. Renaturation par le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside.

Préalablement, S. Baelen<sup>67</sup> a mis en évidence, à la suite d'un criblage, la capacité du DDM à renaturer l'Omp2a dans certaines conditions de pH, de concentration en sels, urée et détergent.

L'étape de renaturation est possible en diminuant la concentration en agent chaotrope et en ajoutant un détergent qui mimera l'environnement membranaire. Une première dilution d'un rapport 1:1 dans un tampon ne contenant pas d'urée permet de diminuer la concentration en agent chaotrope. Une seconde dilution, dans un second tampon contenant le détergent selon un rapport 1:1, permet d'introduire le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM).

La **figure 15** montre le résultat de renaturation dans les conditions établies préalablement : n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside à 20 x CMC (2.4 mM), 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 à température ambiante et concentration en protéine finale : 0,5 mg/ml. La renaturation est rapidement observée : dès l'étape de sonication, on observe des trimères (bande à +/- 100 kDa ; T) et une seule bande au niveau des monomères ( $M_{dn}$ ). Par contre, après deux heures de renaturation, (puits n°3), on observe l'apparition d'une seconde bande correspondant à un poids moléculaire moins important que l'Omp2a. Cet effet est la mobilité électrophorétique. Le monomère, en contact avec le détergent, prend une conformation native ( $M_m$ ) moins volumineuse que le monomère dénaturé, ceci s'observant par un changement de comportement lors de la migration sur gel SDS/PAGE.

### 2.1.1. Optimisation de la température et du temps de renaturation.

Afin d'optimiser le rendement de la renaturation, deux paramètres ont été pris en compte : la température et le temps de renaturation. Pour tester l'influence de ces deux paramètres, des cinétiques de renaturation ont été réalisées pendant 6 jours à 3 températures : 4°C, température ambiante, et 37°C.

Les résultats sont repris à la **figure 16**. Pour chaque température, la renaturation a lieu dès l'étape de sonication (0). Avec le temps, on observe une augmentation de l'intensité des bandes correspondant aux trimères pour chaque température. La renaturation à 37°C semble la plus efficace. En effet, l'intensité des bandes correspondants aux trimères augmente régulièrement tandis que celle des monomères décroît. Au final, après 6 jours et à 37°C, seuls les trimères sont observés. Ces conditions seront utilisées pour les prochaines manipulations.

Sur gel, on observe une bande d'un poids moléculaire légèrement supérieur à celui du monomère d'Omp2a. Il s'agit sans doute d'une erreur lors du rassemblement des fractions de purification mise en évidence par la coloration au nitrate d'argent très sensible (ordre du nanogramme). En effet, on remarque que le poids moléculaire de cette bande est identique à celui de la bande contaminante de la **figure 14 B**. Une fraction contenant la bande contaminante a certainement été incorporée par erreur à l'échantillon utilisé pour la renaturation.

### 2.1.2. Optimisation de la concentration en protéines.

En utilisant les mêmes conditions de renaturation que précédemment (et donc la même proportion de détergent dans le milieu), il est possible de mettre en évidence le rapport optimal protéine/détergent afin d'obtenir le meilleur rendement de renaturation. Pour cela, différentes concentrations en protéines ont été renaturées.

Dès le premier jour de renaturation, (**figure 17**), des trimères sont observés dans les conditions peu concentrées (0,2 et 0,5 mg/ml). Avec le temps, les échantillons plus concentrés ont tendance à se renaturer : après 6 jours, des trimères sont observés dans les échantillons concentrés à 2 mg/ml. Toutefois, les rendements de renaturation restent faibles à des concentrations moyennes et nuls aux hautes concentrations. Par contre, pour de faibles concentrations en Omp2a, l'intensité des bandes relatives aux trimères augmente avec le

temps : après 6 jours, les échantillons à 0,2 et 0,5 mg/ml sont majoritairement constitués de trimères. La concentration en protéines la plus efficace semble être aux alentours de 0,5 mg/ml, soit un ratio de 14  $\mu$ M de protéines pour 12 mM de détergent. Par ce ratio, on peut estimer que pour chaque protéine, environ 900 molécules de détergent sont disponibles (ratio de 1/900). Cette observation correspond aux données de la littérature utilisant un détergent non-ioniques<sup>68</sup>. Remarquons que les gels A et B ont été colorés ensemble tandis que le gel C a été coloré séparément. Les échantillons protéiques des trois gels sont identiques, mais le temps de coloration au nitrate d'argent des gels A et B (**figure 17**) a été plus long, augmentant la coloration et révélant la protéine contaminante.

## 2.2. Renaturation par le système SDS/MPD.

En parallèle de la renaturation par le détergent DDM, un protocole original utilisant le SDS (détergent dénaturant) en association avec le méthylpentanediol (MPD, agent précipitant utilisé en cristallogénèse de protéines) a été appliqué. L'efficacité de renaturation de ce système a été prouvée sur des protéines solubles (lysozyme et anhydrase carbonique) et membranaires en tonneaux  $\beta$  (PagP)<sup>69</sup>. Plusieurs paramètres ont été optimisés dans le cas de l'Omp2a afin d'obtenir le meilleur rendement : le rapport SDS/MPD, la température de renaturation, l'effet du NaCl, la concentration en protéines et le temps de renaturation.

### 2.2.1. Mise au point du ratio SDS/MPD.

Afin de déterminer les quantités de SDS et de MPD optimales à la renaturation de l'Omp2a, celle-ci a été renaturée dans différentes proportions de SDS (de 1 à 2 %) et de MPD (de 1 à 2 M) à 37°C.

Sur la **figure 18**, on observe que l'Omp2a est partiellement renaturée pour chaque concentration en MPD. De plus, la proportion en SDS semble être un facteur influençant fortement l'efficacité de renaturation. Seule la condition 1,5 % SDS induit une renaturation. La concentration à 1,5 M MPD semble la plus efficace. On observe effectivement une plus grande quantité de trimères à cette proportion ainsi qu'une plus grande quantité de monomères renaturés.

Remarquons que ces résultats concordent avec la littérature. Les protéines solubles (lysozyme et anhydrase carbonique) nécessitent de faibles quantités de SDS et de MPD (10 mM SDS et 1 M MPD) pour être renaturées tandis que la protéine membranaire (PagP) nécessite de plus grandes quantités de SDS et de MPD (70 mM SDS et 2 M MPD). La comparaison de PagP et de l'Omp2a montre que ces protéines en tonneaux  $\beta$  nécessitent la même proportion de SDS (1,5% ou 72 mM) et de MPD (1 à 2 M). Les proportions de SDS et de MPD semblent donc être corrélées au type de protéine (soluble ou membranaire).

### 2.2.2. Essais SDS/Alcool : cas de l'éthanol et du méthanol.

Les mécanismes régissant la renaturation de protéines par le système SDS/MPD sont encore incompris. Une hypothèse est que le MPD serait capable de minimiser les propriétés dénaturantes du SDS pour en faire un détergent capable de renaturer une protéine. Le MPD possédant deux fonctions hydroxyles (alcool), il est intéressant de savoir si le changement du comportement du SDS peut être dû à ces fonctions. Des essais de renaturation SDS/éthanol, SDS/méthanol ont été réalisés sur l'Omp2a (**figure 19**). Pour cela, les proportions SDS/alcool et les conditions de renaturation ont été conservées afin de pouvoir comparer l'effet d'alcools à l'effet du MPD.

Dans les deux cas, aucune bande correspondant aux trimères n'est observée. De plus, on n'observe pas le dédoublement des bandes correspondant aux monomères, preuve d'une absence de renaturation.

Ces résultats indiquent que le SDS a conservé ses propriétés dénaturantes malgré la présence de l'éthanol et du méthanol et que le changement du comportement du SDS est dû spécifiquement au MPD. Ces observations correspondent aux résultats obtenus dans la littérature<sup>69</sup> où la protéine PagP (tonneau  $\beta$ ) avait conservé son état dénaturé en présence de SDS et de différents alcools comme l'éthanol et le méthanol.

### 2.2.3. Optimisation de la température et du temps de renaturation.

Afin de déterminer la température optimale de renaturation, l'Omp2a a été renaturée à température ambiante et à 37°C (**figure 20**). Le SDS cristallisant à 4°C, cette température n'a pas été testée.

On remarque que dans les deux cas, la renaturation commence dès la sonication (1). La renaturation semble bien plus efficace à température ambiante qu'à 37°C. On y observe en effet des bandes d'intensité plus importantes au niveau des monomères renaturés et des trimères. Le temps de renaturation optimal semble se situer entre 16 et 22 heures. Au troisième jour de renaturation, la quantité de trimères diminue aux deux températures. Ceci pourrait être dû à une perte de la stabilité de la protéine renaturée dans son état trimérique. D'autres paramètres ont donc été optimisés afin d'augmenter la stabilité de l'Omp2a.

### 2.2.4. Optimisation de la concentration en NaCl.

La force ionique est un facteur qui, potentiellement, pourrait interagir sur le rendement de renaturation. Le SDS étant un détergent anionique, l'arrivée d'anions et de cations pourrait influencer son comportement au sein de micelles. En effet, le SDS étant chargé négativement, l'ion sodium (chargé positivement) peut annihiler la charge négative du SDS et ainsi influencer les effets de charges à la surface des micelles. Pour étudier cet effet, l'Omp2a a été renaturée 4 heures à température ambiante en présence de SDS, MPD et de différentes concentrations en NaCl allant de 20 à 150 mM.

On observe sur la **figure 21** que la concentration en NaCl joue effectivement un rôle sur les rendements de renaturation. Au plus la concentration en sel augmente, au plus les trimères sont observés. À 150 mM de NaCl, le rendement de renaturation est le plus élevé. Par ailleurs, la quantité de sel influence principalement la formation de trimères. En effet, dès 20 mM de NaCl, on observe la renaturation des monomères (pour des proportions élevées en SDS). Cette observation conforte l'hypothèse selon laquelle la renaturation est un phénomène en deux étapes. Premièrement, les monomères sont renaturés et, deuxièmement, ils s'associent entre eux afin de former les trimères, formes natives de l'Omp2a. On remarque également que, contrairement aux résultats précédents, les monomères renaturés et les trimères sont observés dans les conditions contenant 1,5 et 2 % de SDS. La force ionique joue donc sur le comportement du SDS permettant ainsi la renaturation à de plus hautes concentrations en détergent. Remarquons que lors du premier essai de renaturation par le système SDS/MPD, la concentration en NaCl était de 100 mM et la renaturation n'était observée qu'à 1,5 % en SDS. Cela s'explique par l'optimisation de la température. En effet, alors que le premier essai était réalisé à 37°C (pour comparaison avec la renaturation au DDM), l'optimisation de la concentration en NaCl a été réalisée à température ambiante.



### 2.2.5. Optimisation du temps de renaturation et de la concentration en protéines.

L'influence de la quantité de protéines impliquées sur le rendement de renaturation a été testée. Les conditions de renaturation utilisées sont identiques aux conditions utilisées pour les autres essais de renaturation, déterminées comme plus efficace préalablement, seule la concentration en protéine varie.

La **figure 22** montre les résultats de migrations d'échantillons en renaturation depuis 1, 3, 6 et 10 jours. On observe, dès le premier jour, pour les échantillons peu et moyennement concentrés (0,2 à 3 mg/ml), l'apparition de bandes correspondant aux trimères. Avec le temps, on observe l'apparition de trimères dans les échantillons plus concentrés (4 et 5 mg/ml). Au niveau des monomères, on observe leur renaturation pour chaque concentration (de 0,2 à 6,8 mg/ml), nouvelle preuve d'un phénomène séquentiel (renaturation des monomères puis association en trimères). Dès le troisième jour, on observe l'apparition d'une bande d'un poids moléculaire approximatif de 70 kDa qui pourrait correspondre au dimère de l'Omp2a (37 kDa). Au fil du temps, les dimères ont tendance à être plus présents dans les échantillons faiblement concentrés. Les monomères étant encore présents au sein de l'échantillon, l'apparition de dimères ne semble pas liée au manque de matériel protéique mais bien à un défaut de stabilité : les protéines, sous leur forme trimérique auraient une stabilité limitée dans le temps. Ainsi, les échantillons faiblement concentrés, étant renaturés plus rapidement que les échantillons moyennement concentrés, sont les premiers à se déstabiliser et à présenter la forme dimérique.

Le rendement maximum de renaturation retenu est atteint lorsque la concentration en protéine est de 3 mg/ml. A cette concentration, au bout de 10 jours, le rendement de renaturation est optimal. De plus, les dimères ne sont pas observés à cette concentration.

## 3. Essais de séparation des différentes formes protéiques.

Au cours des processus de renaturation, soit au DDM, soit au SDS/MPD, un dédoublement de la bande correspondant aux monomères est observé : l'une serait le monomère dénaturé et l'autre le monomère renaturé. Afin de prouver cette hypothèse, il serait intéressant de pouvoir caractériser séparément les protéines composant les différentes bandes et donc de pouvoir les séparer. Pour cela, deux techniques ont été appliquées à l'omp2a renaturée au DDM.

### 3.1. Tamis moléculaire.

Les protéines constituant les deux bandes sur gel SDS/PAGE devraient pouvoir être séparées selon leurs poids moléculaires respectifs à travers une matrice d'exclusion de taille.

De plus, le tamis moléculaire est une technique qui permettrait d'obtenir expérimentalement le poids moléculaire de l'Omp2a. En effet, son poids moléculaire a été établi théoriquement selon sa séquence en acides aminés, et sa capacité à former des trimères a été proposée suite à des analyses informatiques basées également sur la séquence en acides aminés ainsi que des observations de distances de migration sur gel SDS/PAGE. Il est donc intéressant de réaliser un tamis moléculaire qui permettrait de confirmer ces hypothèses.

A l'aide d'une série d'étalons de poids moléculaires choisis, il est possible de réaliser une droite de calibration en corrélant le poids moléculaire au volume d'élution. Quatre étalons ont

traversé la colonne : l'anhydrase carbonique (29 kDa), l'albumine (66 kDa), l'alcool déshydrogénase (150 kDa) et l'amylase (200 kDa). Dans une seconde phase, il est dès lors possible de corrélérer le logarithme du poids moléculaire avec un facteur k mettant en jeu les volumes d'élution (**table 1**).

	M.W. (Da)	Log M.W	Vo (ml)	Ve (ml)	Ve-Vo (ml)	Vc (ml)	Vc-Vo (ml)	k= $\frac{Ve-Vo}{Vc-Vo}$
Anhydrase carbonique (AC)	29.000	4,46	8,08	15,91	7,83	23,6	15,52	0,50
Albumine (BSA)	66.000	4,82	8,08	13,69	5,61	23,6	15,52	0,36
Alcool déshydrogénase (ADH)	150.000	5,18	8,08	12,33	4,25	23,6	15,52	0,27
Amylase	200.000	5,30	8,08	11,57	3,49	23,6	15,52	0,22

**Table 1 : Etalons de poids moléculaire.** Etablissement d'une droite de calibration. M.W. = poids moléculaire, Vo = Volume mort de la colonne, Ve = Volume d'élution, Vc = Volume de la colonne.

Le coefficient k peut être obtenu en faisant le rapport entre le volume d'élution et le volume de la colonne desquels est, à chaque fois, retiré le volume mort de la colonne. Entre ce facteur k et le logarithme du poids moléculaire existe une relation linéaire<sup>70,71</sup> (**figure 23 A**).

A partir de la droite de calibration obtenue et du volume d'élution des différents éléments composant un échantillon d'Omp2a renaturé au DDM, il est donc possible de déterminer le poids moléculaire de chaque intervenant. Ainsi, le chromatogramme à la sortie de la colonne dévoile 4 pics (**figure 23 B**). Dans notre cas, deux pics sont intéressants: les pics 7 et 8, correspondant respectivement à l'Omp2a trimérique et monomérique. Le poids moléculaire calculé du pic n°8 est de 37 kDa, soit exactement le poids moléculaire attendu pour le monomère d'Omp2a. Le pic n°7 a un poids moléculaire calculé de 113 kDa (**table 2**).

	Vo (ml)	Ve (ml)	Ve-Vo (ml)	Vc (ml)	Vc-Vo (ml)	k= $\frac{Ve-Vo}{Vc-Vo}$	Log M.W.	M.W. (Da)
Monomère	8,08	15,75	7,67	23,6	15,52	0,5	4,56	36.952
Trimères	8,08	12,86	4,78	23,6	15,52	0,3	5,05	112.952

**Table 2 : Calcul des poids moléculaires des formes monomériques et trimériques de l'Omp2a.**

Ces observations prouvent que l'Omp2a native existe sous forme trimérique et que le poids moléculaire du monomère est de 37 kDa et de 113 kDa pour le trimère.

Bien qu'ayant apporté des informations concernant l'Omp2a, le tamis moléculaire ne nous permet pas de séparer le monomère dénaturé du renaturé. En effet, le chromatogramme de sortie du tamis moléculaire révèle 4 pics dont les pics 7 et 8 décrits précédemment. Le volume d'élution du pic5 correspond au volume mort de la colonne (8,08 ml). Il s'agit donc probablement de l'agrégation de protéines menant à un volume trop important que pour pénétrer dans les billes de Sépharose. Le pic 6 correspondrait à l'association de trimères de protéines. Le poids calculé est de 235 kDa, correspondant à la masse de deux trimères.

On n'observe qu'un seul pic correspondant aux monomères. Les deux espèces n'ont donc pu être séparées sur le tamis moléculaire.

### 3.2. Extraction sur gel SDS/PAGE.

La technique du tamis moléculaire n'ayant pas permis de séparer les deux bandes correspondant aux monomères renaturés ou non, une autre technique a été utilisée : l'extraction sur gel SDS/PAGE. La difficulté de cette technique est de savoir où se trouvent les protéines sur le gel afin de les prélever. Le principe est donc de parvenir à marquer les protéines sans en altérer leur structure ou leur fonction. L'idée est de marquer une faible proportion de protéines par des fluorochromes (dyes), permettant de révéler, par fluorescence, la position des protéines sur un gel SDS/PAGE.

Il est nécessaire dans un premier temps de s'assurer que le marquage aux fluorochromes n'affectera pas la structure des protéines. En effet, les fluorochromes utilisés ont pour particularité de se lier aux amines primaires portées par les lysines. Pour cela, deux sets de protéines ont été marqués soit avant, soit après l'étape de renaturation (**figure 24**, en vert pour le marquage avant renaturation et en rouge pour le marquage après). Les fluorochromes ne résistant pas aux hautes températures, la renaturation a eu lieu dans les conditions optimales de renaturation au DDM déterminées préalablement excepté le facteur température (ambiante au lieu de 37°C).

On observe que le marquage avant la renaturation inhibe celle-ci : le dédoublement de la bande correspondant aux monomères n'est pas observé en fluorescence. Par contre, en marquant les protéines après la renaturation, on l'observe en fluorescence. Dans les deux cas, on ne visualise pas de trimères. Par contre, lorsque le gel est coloré au nitrate d'argent (**figure 24**, bas), on observe une grande quantité de trimères. Lors du marquage avant renaturation, ni les monomères, ni les trimères ne sont observés, indiquant que le fluorochrome interfère avec la renaturation.

Les fluorochromes se liant spécifiquement aux résidus lysines, cette expérience nous indique, d'une part, que les lysines de l'Omp2a jouent un rôle dans la renaturation du monomère et, d'autre part, qu'elles se situent dans la lumière du pore et sont donc inaccessibles au marquage au fluorochrome. Cette observation est donc en accord avec la littérature montrant que les résidus des porines situés dans la lumière du pore ont tendance à être chargés et polaires<sup>72</sup>.

La coloration par fluorescence nous permet donc de savoir où se positionnent les monomères renaturés ou non, et de situer approximativement les trimères. On observe en effet, un léger marquage sur le gel qui correspond à la position des trimères marqués au nitrate d'argent. L'étape d'extraction a donc pu être envisagée. Pour ce faire, un grand volume d'Omp2a renaturées a été marqué aux fluorochromes et chargé sur gel SDS/PAGE 15 %. Après migration, ce gel a été scanné (**figure 24 B**). Les protéines sont visualisables (en vert) tant au niveau des monomères (renaturés ou non) que des trimères. Sur ce gel, le marquage des trimères a eu lieu et peut s'expliquer par l'importance du pH pour le marquage des lysines. En effet, à pH 8,5, environ 3% des lysines sont marquées. Lors de la manipulation précédente, le pH était probablement légèrement différent réduisant l'efficacité du marquage. Dans l'hypothèse où les lysines sont peu accessibles sur la forme trimérique et que le marquage est peu efficace, il semble logique de ne pas observer la forme trimérique. Une fois analysé, le gel a été piqué (**figure 24 C**). Les morceaux de gel provenant des bandes correspondant aux trimères ont été rassemblés entre eux au sein du tampon de renaturation (100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 et 2,4 mM DDM) afin de pouvoir les maintenir dans leur état natif. L'étape a été répétée pour les morceaux de gel provenant des bandes correspondant aux

monomères et aux monomères renaturés. Au final, trois groupes distincts ont été obtenus et placés sur agitateur afin d'optimiser l'étape de diffusion des protéines hors des morceaux du gel. Ces diffusions ont été suivies au cours du temps par absorbance des protéines à 280 nm (**figure 25**). On remarque que les protéines sortent particulièrement lentement : après 28 heures, la concentration en trimères, monomères et monomères renaturés est respectivement de 0,4 mg/ml (A), 0,01 mg/ml (B) et 0,029 mg/ml (C). Ces concentrations sont trop faibles que pour pouvoir utiliser les échantillons dans des études structurales ou biophysiques.

De plus, pendant l'étape de diffusion, le monomère renaturé se trouve dans le tampon de renaturation afin de maintenir sa conformation. Il est certain que dans de telles conditions, les monomères renaturés s'associent en trimères et que les monomères dénaturés commencent à se renaturer. On remarque en effet qu'après 8 heures de diffusion, les monomères renaturés diffusent à une vitesse équivalente à celle des trimères.

La technique élaborée ici permet donc de séparer le monomère renaturé du monomère dénaturé à partir du gel SDS/PAGE. Toutefois, il ne nous a pas été possible d'obtenir suffisamment de matériel que pour pouvoir caractériser ces protéines.

## 4. Cristallisation de l'Omp2a.

L'obtention de cristaux de protéines membranaires n'est pas chose aisée. Premièrement, il est nécessaire de posséder une grande quantité de protéine renaturée ( $\approx 10$  mg/ml), pure à environ 90%. Deuxièmement, il faut trouver la (ou les) condition(s) particulière(s) (en agent précipitant, en sels, en tampon, pH, ...) dans la(les)quelle(s) la protéine va cristalliser.

Concernant l'Omp2a, le degré de pureté obtenu après chromatographie échangeuse d'anion est suffisant que pour tenter des essais de cristallogénèse. Des essais de concentration de protéines ont donc été réalisés pour chaque technique de renaturation.

### 4.1. Etape de concentration.

Concernant la renaturation par le DDM, les essais de concentration ont été fructueux (**figure 26 A**) et permettent d'atteindre des valeurs allant jusqu'à 20 mg/ml. Sur gel SDS/PAGE, une fraction concentrée déposée montre que les trimères sont toujours présents après concentration.

Concernant la renaturation par le système SDS/MPD, la concentration des échantillons renaturés a été plus difficile. (**figure 26 B**) En effet, les trimères ne sont plus observés (3) après concentration. Une des hypothèses serait que les amicons utilisés ayant un seuil de 10 kDa, les micelles de SDS (72 kDa) restent bloquées dans le filtre tandis que le MPD est évacué par centrifugation à travers le filtre. Au final, on élimine le cosolvant, permettant ainsi au SDS de retrouver ses propriétés dénaturantes. Nous avons donc diminué la concentration en SDS avant l'étape de concentration. Pour cela, la protéine est renaturée selon le protocole habituel et lorsque l'on obtient une quantité suffisante en trimères, l'échantillon est passé sur un tamis moléculaire permettant de changer le tampon de contention. Ainsi, on passe de 1,5 à 0,15 % en SDS et de 1,5 à 0,15 M en MPD. L'efficacité de cette technique est illustrée à la **figure 26 C** où l'on observe que l'intensité des bandes correspondant aux trimères et aux monomères ne change pas après la diminution de SDS et de MPD. Cette observation nous indique que le SDS et le MPS sont nécessaires en grandes quantités lors de l'étape de renaturation mais que la protéine, une fois renaturée, peut être maintenue native dans de

faibles quantités de SDS et de MPD. Les échantillons renaturés et maintenus dans un tampon moins concentré en SDS et MPD ont été concentrés selon le protocole habituel. Au final, il a été possible d'obtenir un échantillon concentré à 13 mg/ml (**figure 26 D**), concentration acceptable pour des essais de cristallogénèse.

## 4.2. Cristallogénèse.

### 4.2.1. Omp2a renaturée par le DDM.

Précédemment, S. Baelen<sup>67</sup> a mis en évidence une condition dans laquelle l'Omp2a était capable de cristalliser (issue du kit MembFac) : 0,1 M NaCl (sel), 0,1 M Acétate de sodium pH 4,6 (tampon) et 12 % Polyéthylène glycol 6000 (Précipitant). Les cristaux obtenus étant petits et fins (moins de 0,1 mm), un criblage autour de cette condition a été réalisé tel que schématisé à la **figure 27 A et B** dans l'objectif d'obtenir des cristaux de plus grande taille.

Deux sites préférentiels de cristallisation sont observés. Le bord de la goutte semble être un endroit propice à la formation de cristaux de grande taille (jusqu'à 0,1 mm) ayant une ou deux faces bien déterminées (**figure 27 C**) et apparaissant en 4 à 6 semaines. Au sein de la goutte, après une durée allant de 2 à 3 semaines, on observe l'apparition d'une interface étant également un site de cristallisation préférentiel (**figure 27 C**, flèches). Toutefois, les cristaux observés sont de formes indéfinies et de petite taille (0,02 mm). Ces différences de cristallisation au sein de la goutte laissent penser qu'un gradient de concentration prend place.

En dehors de ces deux sites de cristallisation, on observe l'apparition en 6 à 8 semaines de deux formes cristallines majeures : (i) Des cristaux de forme triangulaire (trois faces bien définies) sont obtenus dans de nombreuses gouttes. Leur taille varie de 0,02 mm à 0,1 mm. Au sein d'une même goutte, des différences de taille peuvent être observées. **Les figures 27 D, E et F** montrent différentes zones d'une même goutte. D'un côté de la goutte, les cristaux sont de taille relativement grande (0,05 mm) tandis qu'à l'opposé, les cristaux restent de petite taille. (ii) Des cristaux de forme bipyramidale sont également observés mais sont moins abondants que les cristaux triangulaires. Sur la **figure 27 C**, on observe leur structure bipyramidale. La taille de ces cristaux varie de 0,03 mm à 0,8 mm. Ils sont reproductibles et leurs caractéristiques morphologiques sont similaires de goutte en goutte.

Les cristaux obtenus à partir de la condition 0,1 M NaCl, 0,1 M acétate de sodium pH 6,0 et 16 % PEG<sub>6000</sub> ne diffractent pas les rayons X (tests effectués au synchrotron de Grenoble). Il est donc nécessaire de mettre en évidence de nouvelles conditions de cristallisation. Pour cela, d'autres kits commerciaux ont été testés sur l'Omp2a renaturée au DDM. Parmi ces kits, deux nouvelles conditions ont été révélées.

Premièrement, dans 0,1 M NaCl, 0,1 M Hepès de sodium pH 7,5 et 10 % de polyéthylène glycol<sub>400</sub>, de petits cristaux ont été obtenus en 2 semaines. Un criblage autour de cette condition a permis d'obtenir une grande quantité de cristaux relativement petits (**figure 28 A**) sur le bord de la goutte tandis qu'au centre, leur taille est plus importante (**B et C**).

Deuxièmement, dans 0,1 M de sulfate de lithium, 0,1 M de citrate de sodium pH 6 et 12 % de polyéthylène glycol<sub>6000</sub>, des agrégats de forme indéfinie sont observés (**figure 29**). Leur taille varie fortement (allant de 0,05 à 0,4 mm). Cette dernière condition n'a pas encore pu être optimisée.

#### 4.2.2. Omp2a renaturée par le SDS/MPD.

L'Omp2a renaturée au SDS/MPD a pu être concentrée après une diminution de la quantité de SDS et de MPD jusqu'à atteindre une valeur de 13 mg/ml. Bien que le rendement de renaturation ne soit pas parfait (encore beaucoup de monomères), des essais de cristallogenèse d'Omp2a avec le kit MembFac® ont été réalisés. Une première observation est que le SDS cristallise dans la plupart des gouttes (cristaux en forme d'aiguilles). Au sein d'une condition particulière (0,1 M Sulfate de sodium, 0,1 M Hepès de sodium pH 7,5 et 0,1 M Tartrate de potassium et sodium tétrahydrate), un cristal de grande taille est observé (**figure 30**). Après 4 mois de latence, le cristal s'est formé en deux semaines jusqu'à atteindre la taille actuelle d'un millimètre. Les faces du cristal sont bien définies et forment un losange se développant dans deux dimensions principalement. Actuellement, nous ne pouvons pas encore dire avec certitude que le cristal est formé de protéines et non de sels. Cette condition sera donc à investiguer.

## D. Conclusions et perspectives

Les objectifs de ce mémoire étaient de surproduire, purifier, renaturer et cristalliser la porine Omp2a de *Brucella melitensis*. A partir des résultats obtenus, il est possible de tirer plusieurs conclusions.

L'étape de surproduction en corps d'inclusion, mise au point par J.Y. Paquet<sup>39</sup>, s'est révélée efficace pour l'Omp2a et permet d'obtenir une grande quantité de protéines solubles mais non-natives. L'étape de purification par chromatographie échangeuse d'anions, une fois améliorée en optimisant le gradient en NaCl, a permis d'obtenir un échantillon protéique dont la pureté était suffisante pour les étapes de renaturation et cristallisation.

À partir de celui-ci, il a été possible de renaturer l'Omp2a par deux méthodes distinctes. La première méthode était l'utilisation d'un détergent non-ionique, le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (ou DDM) qui s'était révélé efficace précédemment pour renaturer l'Omp2a. L'optimisation de différents paramètres tels que la température, le temps de renaturation et la quantité de protéines impliquées a permis d'augmenter le rendement de renaturation. Ainsi, dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl et 2,4 mM DDM (20 x CMC) par la technique de dilution pendant 6 jours à 37°C, il a été possible d'obtenir un échantillon protéique (0,5 mg/ml) exclusivement constitué de trimères.

La protéine a également pu être renaturée en utilisant une méthode relativement récente et originale. Dans 1,5 % SDS (dénaturant), 1,5 M MPD, 150 mM NaCl et 50 mM Tris-HCl pH 8, il a été possible d'obtenir un rendement de renaturation proche de 40%. Ces résultats permettent de conclure que les proportions en SDS et MPD de ce système de renaturation sont dépendantes du type de protéine à renaturer. Ainsi, pour des protéines membranaires en tonneaux  $\beta$  (PagP et Omp2a), les quantités de SDS nécessaires sont élevées (1,5 % SDS) tandis que pour des protéines solubles (lysozyme et anhydrase carbonique), ces proportions sont moindres (moins de 0,1 % de SDS nécessaire).

Lors de l'étape de renaturation, on observe trois intervenants : le monomère, le monomère renaturé et le trimère. L'hypothèse est que les monomères sont renaturés (observation du dédoublement de bande) et dans un second temps, ces monomères s'associent pour former l'espèce trimérique (**figure 31**).

Afin de pouvoir confirmer ou non cette hypothèse, nous avons tenté d'isoler chacun des intervenants. Le tamis moléculaire n'a pas permis de séparer le monomère dénaturé du monomère renaturé mais a permis de confirmer la présence de trimères, permettant d'affirmer que l'Omp2a appartient avec certitude à la classe des porines trimériques. Le tamis moléculaire a permis d'obtenir des informations expérimentales concernant le poids moléculaire de l'Omp2a des intervenants : 37 et 113 kDa respectivement pour les monomères et trimères. Une autre technique a été mise en œuvre afin de tenter de séparer les différentes bandes observées : l'extraction sur gel SDS/PAGE. Cette méthode a permis de séparer des fragments de gel correspondant aux différentes bandes. Toutefois, la technique de diffusion par osmose, utilisée afin d'extraire physiquement les protéines des fragments de gel, ne s'est pas révélée efficace et nous n'avons pas obtenu le matériel en quantité exploitable.

Enfin, nous avons tenté de cristalliser l'Omp2a renaturée soit par le DDM, soit par le système SDS/MPD.

À partir de la protéine renaturée par le DDM, nous avons pu obtenir trois conditions de cristallisation. (i) Une première condition a permis à l'Omp2a de cristalliser en 6 semaines : 100 mM NaCl, 100 mM Acétate de sodium pH 6 et 16% PEG<sub>6000</sub>. Les cristaux obtenus dans cette condition sont de formes particulièrement bien définies (triangulaires et bipyramidales).



En optimisant cette condition par criblage, un grand nombre de cristaux de taille supérieure ont été obtenus. Des essais de diffraction de rayons X menés au synchrotron de Grenoble ont permis d'établir avec certitude que ces cristaux sont formés de protéines (ii) Une seconde condition de cristallisation a mené à la formation de cristaux en 2 semaines : 100 mM NaCl, 100 mM Sodium Hepès pH 7,5 et 10 % PEG<sub>400</sub>. Dans cette condition, les cristaux formés restent de taille relativement petite mais sont présents en un très grand nombre (plus d'une centaine par goutte). (iii) Une dernière condition a mené à la cristallisation de l'Omp2a en 6 semaines : 100 mM Sulfate de Lithium, 100 mM Citrate de Sodium pH 6 et 12% PEG<sub>6000</sub>. Les cristaux obtenus dans cette condition ne possèdent pas de faces définies.

La renaturation par le système SDS/MPD a permis d'obtenir un cristal en 4 mois à partir de la condition : 100 mM Sulfate de Lithium, 100 mM Hepès de sodium pH 7,5 et 100 mM Tartrate de potassium et sodium. Le cristal obtenu dans cette condition possède des faces bien définies mais sa composition n'a pas encore été déterminée.

Plusieurs perspectives sont proposées pour poursuivre ce travail.

Dans un premier temps, il serait intéressant d'optimiser le rendement de renaturation par le système SDS/MPD en déterminant d'autres paramètres influençant la renaturation. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer la concentration en NaCl. En effet, parmi les concentrations testées (20 à 150 mM), on observait un rendement maximum à 150 mM. Toutefois, il serait intéressant de voir ce qu'il se passe à des concentrations plus élevées en NaCl (200 à 500 mM par exemple) afin de déterminer une concentration optimale pour la renaturation de l'Omp2a. D'autres paramètres pourraient également être envisagés tel que le pH ou l'effet de la sonication qui semblerait efficace pour minimiser l'agrégation de micelles de hauts poids moléculaires.

Dans un second temps, il serait intéressant de parvenir à séparer les différentes bandes observées sur gel. Une première idée serait de réaliser un tamis moléculaire avec une colonne plus adaptée. En effet, dans le cas de l'Omp2a, nous avons utilisé une colonne permettant de séparer des poids moléculaires allant de 25 kDa à 200 kDa afin de pouvoir isoler les monomères des trimères. Il serait intéressant d'utiliser une colonne plus adaptée au poids moléculaire des monomères (renaturés ou non). Par exemple, l'utilisation d'une colonne séparant les poids moléculaires allant de 15 à 60 kDa devrait mener à de meilleurs résultats. Une seconde idée serait d'améliorer la technique d'extraction sur gel SDS/PAGE. Des protocoles issus de la littérature font état d'une meilleure diffusion lorsque le détergent présent au sein de l'échantillon est le SDS<sup>73,74</sup>. Cette technique pourrait donc être appliquée à l'Omp2a renaturée par le système SDS/MPD. La séparation des trois espèces (trimères, monomères renaturés ou non) permettrait de les caractériser par des techniques biophysiques comme le dichroïsme circulaire ou la fluorescence intrinsèque et ainsi confirmer la renaturation de la protéine. Par ailleurs, il devrait être possible de développer un outil permettant de suivre la renaturation en temps réel par la technique de fluorescence intrinsèque.

Concernant la diffraction de rayons X, les cristaux d'Omp2a renaturée au DDM n'ont pas ou peu diffracté. Il serait donc intéressant de mettre en évidence de nouvelles conditions de cristallisation ou d'optimiser les conditions existantes. Un détergent particulièrement utilisé en cristallogénèse et en diffraction de rayons X est l'Octyl-glucoside (OG) et des essais pourraient être menés sur l'Omp2a.

Pour finir, ce mémoire a été axé sur l'Omp2a. Or, le locus *omp2* de *Brucella melitensis* encode pour une deuxième porine, l'Omp2b. Il serait donc intéressant d'appliquer les

méthodes mises au point pour l'Omp2a à l'Omp2b et voir si cette dernière réagit de la même manière. L'obtention des deux structures tridimensionnelles permettrait de les comparer et de mieux comprendre leur fonctionnement. D'autres OMPs existent au sein du génome de *Brucella melitensis* et pourraient également être sujettes à des essais de surproduction, purification, renaturation et cristallisation en vue de comprendre leurs rôles pour la bactérie.

## E. Matériel et méthodes

# 1. Techniques relatives aux bactéries

## 1.1. Surexpression protéique par culture bactérienne

La surexpression de protéines est possible grâce à la souche « *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS (Novagen) ». Le plasmide pLysS contient la séquence CDS du lysozyme T7. Celui-ci réduit le niveau d'expression basale du gène cible sous contrôle du promoteur T7. Cette répression est levée lors de l'induction à l'isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG).

Génotype de la souche : F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>* (*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3), pLysS, Cm<sup>r</sup>.

Cette souche a été préalablement transformée par un vecteur de type pET3a (Novagen). Ce vecteur est construit afin d'optimiser l'étape de surproduction et contient un gène de résistance à l'ampicilline (**figure 32**). Le gène codant pour l'*omp2a* est inséré entre les sites *NdeI* et *BamHI*.

La souche d'*Escherichia coli* étant transformée par le vecteur pET3a contenant l'ORF de l'Omp2a, il suffit de la cultiver pour obtenir de grandes quantités de la protéine d'intérêt.

1. Préculture bactérienne : dans 10 ml de milieu LB liquide (11 : 10g d'hydrolysate de caséine, 5g de NaCl et 5g d'extrait de levure) autoclavé (20 minutes à 120°C), additionné de Chloramphénicol (20  $\mu$ g/ml) et d'Ampicilline (100  $\mu$ g/ml), ensemencer la souche bactérienne transformée. Incubation pendant la nuit à 37°C en agitation.
2. Inoculer 200 ml de milieu LB liquide autoclavé et additionnée de chloramphénicol et d'ampicilline avec 2 ml de préculture dans un erlenmeyer de 1 litre avec pales (pour une meilleure oxygénation du milieu). Incuber la culture à 37°C sous agitation jusqu'à obtenir une densité optique (600 nm) de 0,6 à 0,8.
3. Induction de la surexpression de la protéine d'intérêt par ajout d'IPTG en concentration 48  $\mu$ g/ml et incuber 3h à 37°C sous agitation.
4. Centrifugation des bactéries 30 minutes à 4000 g à 4°C. Congeler le culot à -20°C.

## 1.2. Lyse bactérienne et lavage des corps d'inclusion

A ce stade, la protéine d'intérêt se trouve sous la forme de corps d'inclusion au sein du cytoplasme des bactéries. L'étape de lyse permet donc de séparer les corps d'inclusion des éléments bactériens. L'étape de lavage des corps d'inclusion permet d'éliminer un maximum d'éléments contaminants (ADN, protéines de la cellule hôte, ribosome, ...). (Protocole J.Y. Paquet<sup>40</sup>).

1. Resuspendre le culot bactérien dans 6 ml de tampon TEN de lyse (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 1 mM EDTA, 1g/l NaCl, 125  $\mu$ M PMSF, 250  $\mu$ g/ml lysozyme) et incuber 20 minutes à température ambiante.
2. Ajout de 8 mg de déoxycholate de sodium (étape de lyse) et incuber une heure à 37°C sous agitation.
3. Ajout de 2 mg de DNaseI et incuber une heure à température ambiante.
4. Centrifugation 20 minutes à 14.000 g à 4°C.
5. Lavage (1/2) des corps d'inclusion avec 10 ml de tampon de lavage (2 M urée, 20 mM Tris-HCl pH 8 ; 500 mM NaCl ; Triton X-100 2%) et centrifugation 20 minutes à 14.000 g à 4°C.
6. Lavage (2/2) des corps d'inclusion avec 10 ml de tampon de lavage et centrifuger 20 minutes à 14.000 g à 4°C.

7. Solubilisation des corps d'inclusion dans 6 ml de tampon TEN de solubilisation (50 mM Tris-HCl pH 8 ; 1 mM EDTA ; 1g/l NaCl ; 8 M urée) et laisser incuber une nuit à température ambiante sous agitation.

## 2. Techniques relatives aux protéines

### 2.1. Purification des corps d'inclusion par chromatographie échangeuse d'ions

La technique de chromatographie échangeuse d'ions est utilisée pour purifier les corps d'inclusion. Le principe consiste à séparer les protéines en fonction de leur point isoélectrique (pI). La charge nette d'une protéine dépend du pH du milieu dans lequel elle se trouve. A une valeur seuil (le point isoélectrique) de pH, la charge nette de la protéine est neutre. Au-delà de cette valeur, la protéine sera globalement chargée positivement tandis que sous cette valeur, la protéine sera globalement chargée négativement. Dans le cas de l'Omp2a, le pI calculé est de l'ordre de 4,2. En se mettant donc à une valeur de pH supérieure, on s'assure que la protéine est globalement chargée négativement et peut donc se lier à une colonne portant des groupements chargés positivement. La colonne utilisée est une colonne de Sépharose (DEAE) portant des charges positives. Le principe consiste à charger les protéines issues des corps d'inclusion sur la colonne à un certain pH et d'ensuite éluer séparément les différents acteurs par un gradient en contre-anion (ici, le  $\text{Cl}^-$  venant du NaCl). Les contre-anions entreront alors en compétition avec les protéines permettant leur élution. Le système de purification utilisé est fourni par la société Biorad® et le principe est schématisé à la **figure 33**.

1. Passage de l'échantillon à travers un filtre de 0,22  $\mu\text{m}$ .
2. Lavage du système Biorad®. Passer un volume d'eau distillée (filtrée et dégazéifiée), deux volumes de colonne du tampon A (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 17 mM NaCl et 8 M urée) et réaliser un autozéro de l'absorbance UV.
3. Injecter l'échantillon à un débit de 1 ml/minute du tampon A et élution du flow-through (toutes les protéines ne se liant pas à la colonne).
4. Elution de l'Omp2a : gradient en NaCl. Ce gradient est obtenu en mélangeant progressivement le tampon A au tampon B (50 mM Tris-HCl pH 8,0 ; 500 mM NaCl et 8 M urée). Sur 50 ml, on passe de 0 à 100 % de tampon B à un débit de 1 ml par minute. Récupérer des fractions de 1 ml à la sortie de la colonne.
5. Lavage du système. Passer deux volumes de colonne de NaOH 1M et deux volumes d'eau distillée. Pour stockage, passer un volume de colonne d'éthanol 20% et stocker à 4°C.

### 2.2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (SDS/PAGE)

Il est possible de séparer des protéines selon leur poids moléculaire respectif en faisant migrer les protéines au travers d'un gel de polyacrylamide. L'acrylamide polymérise en présence de persulfate d'ammonium (APS) et de N-tétraméthyl-1,2-diaminométhane (TEMED). Un réseau réticulé se forme donc et est fonction de la quantité d'acrylamide utilisée. Globalement, plus une protéine sera lourde (volumineuse), plus elle migrera difficilement au sein du réseau. La migration est induite par un champ électrique maintenu entre deux électrodes. L'utilisation de SDS (détergent anionique fort) permet de charger les protéines et donc de les rendre sensibles au champ électrique.

Afin d'estimer le poids moléculaire de protéines, il existe des étalons composés de protéines dont le poids moléculaire est connu.

Deux types de gels coexistent : le gel d'empilement, dense permettant de compacter les protéines chargées et d'obtenir une meilleure résolution et le gel de séparation permettant de séparer les protéines selon leur poids moléculaire.

Protocole d'un gel de polyacrylamide :

1. Couler le gel de séparation. Recouvrir d'éthanol afin de minimiser la présence d'oxygène inhibant la réaction de polymérisation.
2. Couler le gel d'empilement. Insérer un peigne de 10 ou 12 puits selon l'utilisation.
3. Préparation de la cuve de migration. Lorsque le gel est placé dans la cuve, remplir de tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 9, 192 mM Glycine et 0,1 % SDS).
4. Chargement des échantillons additionnés de tampon d'échantillon (pour 1 ml : 350 µl H<sub>2</sub>O, 125 µl Tris-HCl (0,5 M) pH 6,8, 250 µl glycérol, 200 µl SDS 10 %, 20 µl bleu de bromophénol (0,5%) et 50 µl β-mercaptoéthanol) et de l'étalon de poids moléculaire.
5. Migration 45 à 60 minutes sous 200 volts. La migration doit être arrêtée lorsque le front de migration atteint la fin du gel.

### 2.3. Coloration au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent

Le bleu de Coomassie est un colorant capable de se fixer aux protéines. Son utilisation permet de visualiser la position des différentes protéines au sein d'un gel par rapport à l'étalon de poids moléculaire.

1. Le gel de polyacrylamide est rincé à l'eau distillée.
2. Dépôt du gel dans une solution de Bleu de Coomassie (0,25 g de bleu de Coomassie, 45 ml de méthanol, 10 ml acide acétique et porter à 100 ml avec eau distillée) et incubé 30 à 60 minutes.
3. Décolorer le gel dans une solution de coloration (300 ml de méthanol, 100 ml acide acétique et porter à 1 litre avec eau distillée) jusqu'à l'observation des bandes.

La coloration au bleu de Coomassie a pour avantage d'être rapide et facile à réaliser. Toutefois, la limite de détection au bleu de Coomassie ne dépasse pas les 100 ng. Il est parfois intéressant de colorer un gel au nitrate d'argent. Cette technique est plus difficile à mettre en pratique mais à l'avantage d'avoir un seuil de détection de l'ordre du ng.

1. Lavage du gel deux heures dans 250 ml d'eau distillée. (Cette étape n'est nécessaire qu'à la suite d'une coloration au bleu de Coomassie).
2. Etape de fixation : deux fois 15 minutes dans une solution de 25 ml d'acide acétique, 100 ml de méthanol et 125 ml d'eau.
3. Etape de sensibilisation : 30 minutes dans une solution contenant 75 ml de méthanol, 10 ml de thiosulfate de sodium 5%, 17 g d'acétate de sodium et 165 ml d'eau.
4. Etape de rinçage : trois fois 5 minutes dans 250 ml d'eau.
5. Etape de coloration : 20 minutes dans une solution de 25 ml de nitrate d'argent 2,5 % et 225 ml d'eau.
6. Etape de rinçage : deux fois une minute dans 250 ml d'eau.
7. Etape de développement : Le gel est placé dans une solution contenant 6,25 g de carbonate de sodium, 100 µl de formaldéhyde et 250 ml d'eau. La durée de cette étape est fonction de la vitesse d'apparition des bandes.
8. Arrêt de la réaction : 1,65 g d'EDTA et 250 ml d'eau pendant 10 minutes.
9. Etape de lavage : trois fois 5 minutes dans 250 ml d'eau.

## 2.4. Suivi de la renaturation

Il existe une technique simple et efficace pour observer la renaturation de protéines en tonneau  $\beta$  : la mobilité électrophorétique. Sur gel SDS/PAGE traditionnel, ces protéines migrent à des poids moléculaires différents selon qu'elles soient sous leur forme native ou dénaturée<sup>75</sup>. Ainsi, une protéine dans son état natif migrera différemment d'une protéine complètement dénaturée. Cette différence de migration est due à une structure plus compacte des tonneaux  $\beta$  par rapport à une protéine sans structure secondaire. Ainsi, pour une même séquence, la forme dénaturée prend plus de place que la forme native. La migration SDS/PAGE étant basée sur le poids moléculaire des protéines et donc indirectement sur leur volume, une différence de migration peut s'observer entre ces deux formes. Par exemple, l'OmpA migre selon un poids de 30 kDa sous sa forme native, tandis qu'après dénaturation, elle migre selon un poids de 35 kDa<sup>76</sup>. Un autre exemple est la porine FomA dont la forme native migre selon une masse moléculaire de 40 kDa tandis que la forme dénaturée migre selon un poids de 37 kDa<sup>77</sup>. Toutefois, la différence de poids moléculaire entre l'échantillon natif et l'échantillon dénaturé peut varier fortement. Citons par exemple la protéine FhuA dont la forme native migre selon un poids moléculaire de 78 kDa tandis que la forme dénaturée atteint les 54 kDa. La différence de mobilité électrophorétique est donc fonction de la protéine.

## 2.5. Renaturation des protéines

### 2.5.1. Via n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside

La technique utilisée pour la renaturation via le n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside consiste à diluer la protéine (Omp2a) dans un tampon contenant le détergent. Le choix du détergent a été mis en évidence lors du mémoire de S. Baelen<sup>67</sup> ainsi que la quantité optimale en urée, à savoir 2 M.

Dans un premier temps, un volume de solution protéique purifié (tampon de purification contenant 8 M urée) est dilué dans un volume de tampon de dilution afin de réduire par deux la concentration en urée. Ensuite, ce volume sera dilué deux fois dans un tampon contenant le détergent.

1. Diluer la solution protéique dans un même volume de tampon de dilution (50 mM Tris-HCl pH 8 ; 250 mM NaCl). La concentration en urée descend à 4 M.
2. Sur vortex, ajouter goutte à goutte la solution protéique diluée dans le tampon de renaturation (50 mM Tris-HCl pH 8 ; 250 mM NaCl et 2,4 mM (20 x CMC) n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside).
3. Sonication de l'échantillon 15 minutes à température ambiante.
4. Placer les échantillons sur agitateur le temps de la renaturation.

### 2.5.2. Via SDS/MPD

Après l'étape de purification, la protéine se trouve dans un tampon contenant 8 M urée, approximativement 250 mM NaCl et 50 mM Tris-HCl pH8. La renaturation par le système SDS/MPD nécessite d'enlever l'urée du milieu. L'utilisation d'une colonne de dessalage (PD-10) permet d'ôter l'urée.

1. Conditionner la colonne de dessalage en passant 25 ml du tampon de purification (50 mM Tris-HCl pH8 ; 250 mM NaCl).
2. Déposer 2,5 ml de la solution protéique sur colonne.

3. Changement de milieu : Passer 3,5 ml du tampon dans lequel on souhaite obtenir la protéine (habituellement pour les essais de renaturation : 50 mM SDS ; 1,5 M MPD; 50 mM Tris-HCl pH 8 ; 50 mM NaCl. Remarquons que la protéine est diluée par un facteur 1,4 lors du passage à travers la colonne de dessalage.
4. Sonication de l'échantillon 15 minutes à température ambiante.
5. Placer les échantillons sous agitation le temps de la renaturation.

## 2.6. Chromatographie d'exclusion : tamis moléculaire

La chromatographie d'exclusion (ou tamis moléculaire) est une technique qui permet de séparer différentes protéines issues d'un même échantillon en fonction de leur poids moléculaire. La colonne de séparation est constituée de dextran et de glucose réticulés formant des billes poreuses. Les protéines de haut poids moléculaires étant volumineuses, ont un trajet d'élution court (**figure 34**) tandis que les molécules de faibles poids moléculaires pénètrent dans les billes augmentant ainsi leur distance de parcours.

Il est possible, à partir de protéines de poids moléculaires connus et des volumes d'élution correspondant, de réaliser une droite de calibration de la colonne. Celle-ci permettra ensuite, à partir du volume d'élution d'une protéine de poids moléculaire inconnu, d'estimer ce poids moléculaire.

Dans le cadre de ce travail, la colonne utilisée est une colonne Superdex S75 permettant de séparer de manière optimale les protéines allant d'un poids moléculaire de 37 kDa à 150 kDa (gamme de poids moléculaire de l'Omp2a monomérique ou trimérique).

1. Conditionnement de la colonne Superdex S75 :
  - Passer un volume de colonne d'eau désionisée et dégazéifiée.
  - Passer deux volumes de colonne du tampon dans lequel se trouve la protéine.
2. Etablissement de la droite de calibration :
  - Injecter le dextran (molécule de très haut poids moléculaire permettant de déterminer le volume mort de la colonne, c'est-à-dire le volume de la colonne sans les billes).
  - Injecter les étalons moléculaires (Afin d'obtenir une meilleure résolution, il est intéressant de les injecter en deux temps).
3. Injection de l'échantillon protéique d'Omp2a. Volume maximum 250 µl.
4. Nettoyage de la colonne :
  - Passer un volume de colonne d'eau désionisée.
  - Passer deux volumes de colonne d'éthanol 20%
  - Stocker la colonne à 4°C.

## 2.7. Extraction sur gel

Lors des essais de renaturation, une seconde bande d'un poids moléculaire inférieur aux monomères apparaît sur gel SDS/PAGE. Dans le but de pouvoir étudier la nature des protéines la composant, il serait intéressant de parvenir à isoler les protéines des deux bandes. L'idée est de marquer une très faible proportion de protéines par des fluorochromes (moins de 1%). Les protéines marquées sont ensuite mélangées à un set de protéines non marquées. L'échantillon protéique subit ensuite les étapes habituelles : renaturation et migration sur gel SDS/PAGE classique. Les protéines marquées sont alors révélées et reflètent la position des protéines non-marquées. Un programme informatique (Decyder) permet alors de sélectionner des zones précises sur le gel à piquer. Au final, on obtient des morceaux de gel SDS/PAGE contenant les protéines d'intérêt.



### 2.7.1. Marquage aux fluorochromes

Dans le cadre de ce travail, deux marquages ont été testés : avant et après renaturation. L'étape de marquage aux fluorochromes est donc soit précédée, soit suivie d'une étape de renaturation définie au point 2.3.1.

1. Ajustement du pH de l'échantillon à pH 8,5 exactement. En effet, les fluorochromes ne sont capables de se fixer qu'aux amines primaires protonées. Le pH de l'environnement doit donc être exactement à 8,5 afin de s'assurer que les amines primaires sont protonées. L'expérience du laboratoire montre qu'à ce pH, le marquage aux fluorochromes concerne 3% des protéines de l'échantillon. Cette proportion décroît très rapidement dès que l'on s'éloigne du pH 8,5.
2. Préparation des fluorochromes. Dilution des fluorochromes commerciaux (GE Health Care, CyDye™ DIGE Fluors, Cy3 et Cy5 minimal Dyes) (0,12 µl) dans du DMF (1,08 µl).
3. Marquage des protéines : mélange de 3 µl de protéines (5 µg/µl) avec les dyes préparées. Agiter et centrifuger brièvement. Repos 30 minutes sur glace à l'abri de la lumière, ensuite, ajout de 1 µl de lysine 10 mM et laisser reposer 10 minutes sur glace à l'abri de la lumière. L'ajout de lysine permet de fixer les fluorochromes en excès. Les lysines marquées seront éliminées lors de la migration de l'échantillon protéique sur gel SDS/PAGE de par leur faible poids moléculaire.

### 2.7.2. Extraction par diffusion

A la sortie de l'étape de piquage, on obtient une multitude de morceaux de gel SDS/PAGE. Il existe plusieurs techniques pour extraire les protéines de ces morceaux de gel. La technique utilisée ici est la diffusion par osmose : les protéines sont plus concentrées dans le gel que dans le tampon de renaturation (50 mM Tris-HCl pH8 ; 50 mM NaCl, 24 mM DDM) dans lequel le gel est placé afin de maintenir la protéine sous sa forme native lors de la diffusion. Le suivi de la sortie des protéines est assuré par la mesure d'absorbance à 280 nm.

## 3. Techniques relatives à la cristallogénèse

### 3.1. Concentration des protéines

Afin de pouvoir réaliser des essais de cristallogénèse, les protéines doivent être, en moyenne, à une concentration de 10 mg/ml.

Pour concentrer une protéine, il existe le système Amicon Ultra15 (Millipore). Deux réservoirs sont séparés par un filtre dont le seuil est de 10 kDa. En centrifugeant l'échantillon, les composants dont le poids moléculaire est inférieur à 10 kDa sortent et sont évacués. Les molécules de poids supérieur à 10 kDa restent dans l'échantillon. Globalement, le tampon est évacué alors que les protéines restent. Un phénomène de concentration en protéine est donc observé. Typiquement, plusieurs étapes successives de centrifugation (10 minutes à 4000 g) sont réalisées.

### 3.2. Cristallogénèse

Afin de cristalliser une protéine membranaire intégrale, il existe principalement deux techniques : La diffusion de vapeur et la diffusion de liquide. Dans les deux cas, l'objectif est d'atteindre un état de saturation en protéines nécessaire à la nucléation et à la croissance cristalline. Au cours de ce travail, seule la diffusion de vapeur a été utilisée pour cristalliser les protéines (**figure 35**). Dans ce cas, l'état de saturation en protéines est atteint par

l'évaporation lente d'un solvant (l'eau). Dans une enceinte fermée, on place, sans les mettre en contact, deux solutions : (i) une solution de faible volume (goutte) contenant la protéine à cristalliser, un agent précipitant et un tampon. (ii) une solution de moyen volume (solution mère) contenant l'agent déshydratant. Ce dernier a pour rôle de réduire la pression partielle en eau dans le réservoir. Les deux solutions (petit et moyen volume) ayant des pressions partielles en eau différentes, l'eau va diffuser jusqu'à atteindre un équilibre en pression partielle entre les deux solutions. Si la pression de vapeur d'eau est inférieure à celle de la goutte, il y aura transfert d'eau de la goutte vers le réservoir. En conséquence, tous les composants de la goutte vont se concentrer. Au final, la goutte contenant la solution protéique s'assèche, la concentration en protéine augmente jusqu'à atteindre une étape dite de « nucléation ». Les protéines s'agenceront alors selon un réseau ordonné qui formera le cristal.

### **3.2.1. Technique de la goutte suspendue**

La technique de la goutte suspendue permet de former des gouttes dont le volume peut atteindre 5  $\mu$ l. Afin de pouvoir tester différentes conditions, la cristallogenèse se fait dans des boîtes multipuits.

1. Remplir chaque puits de 500  $\mu$ l de solution mère (contenant sels, précipitant et tampon).
2. Graisser les contours des puits.
3. Sur lame de verre siliconé, former une goutte de 2  $\mu$ l de solution protéique et 2  $\mu$ l de solution mère.
4. Retourner la lame de verre et rendre le compartiment hermétique.

### **3.2.2. Technique de la goutte assise**

Par cette technique, il est possible de former des gouttes de plus grands volume : jusqu'à 20  $\mu$ l. Comme son nom l'indique, cette technique utilise des « ponts » permettant de porter la goutte au-dessus de la solution mère.

1. Remplir chaque puits de 500  $\mu$ l de solution mère.
2. Graisser les contours des puits.
3. Placer les ponts dans les puits et y déposer 10  $\mu$ l de solution protéique et 10  $\mu$ l de solution mère.
4. Fermer hermétiquement les puits avec une lame de verre.

## F. Références bibliographiques

- <sup>1</sup> Martelli, P. L., P. Fariselli, et al. (2003). "The prediction of membrane protein structure and genome structural annotation." Comp Funct Genomics **4**(4): 406-409.
- <sup>2</sup> Gromiha, M. M. and M. Suwa (2007). "Current developments on beta-barrel membrane proteins: sequence and structure analysis, discrimination and prediction." Curr Protein Pept Sci **8**(6): 580-599.
- <sup>3</sup> Deisenhofer, J., O. Epp, et al. (1984). "X-ray structure analysis of a membrane protein complex. Electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*." J Mol Biol **180**(2): 385-398.
- <sup>4</sup> North, A.C., D.C. Phillips. (1969). "X-ray studies of crystalline proteins." Prog. Biophys. Mol. Biol. **19**(1) : 1-132.
- <sup>5</sup> Raman, P., V. Cherezov, et al. (2006). "The Membrane Protein Data Bank." Cell Mol Life Sci **63**(1): 36-51.
- <sup>6</sup> Saier, M. H., Jr. (2006). "Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria." J Membr Biol **214**(2): 75-90.
- <sup>7</sup> Wirth, C., G. Condemine, et al. (2009). "NanC crystal structure, a model for outer-membrane channels of the acidic sugar-specific KdgM porin family." J Mol Biol **394**(4): 718-731.
- <sup>8</sup> Welte, W., U. Nestel, et al. (1995). "Structure and function of the porin channel." Kidney Int **48**(4): 930-940.
- <sup>9</sup> Hoenger, A., J. M. Pages, et al. (1993). "The orientation of porin OmpF in the outer membrane of *Escherichia coli*." J Mol Biol **233**(3): 400-413.
- <sup>10</sup> Weiss, M. S., A. Kreusch, et al. (1991). "The structure of porin from *Rhodobacter capsulatus* at 1.8 Å resolution." FEBS Lett **280**(2): 379-382.
- <sup>11</sup> Cowan, S. W., T. Schirmer, et al. (1992). "Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins." Nature **358**(6389): 727-733.
- <sup>12</sup> Rosenbusch, J. P. (1990). "Structural and functional properties of porin channels in *E. coli* outer membranes." Experientia **46**(2): 167-173.
- <sup>13</sup> Kreusch, A., A. Neubuser, et al. (1994). "Structure of the membrane channel porin from *Rhodospseudomonas blastica* at 2.0 Å resolution." Protein Sci **3**(1): 58-63.
- <sup>14</sup> Giuliodori, A. M., C. O. Gualerzi, et al. (2007). "Review on bacterial stress topics." Ann N Y Acad Sci **1113**: 95-104.
- <sup>15</sup> Benz, R. (1988). "Structure and function of porins from gram-negative bacteria." Annu Rev Microbiol **42**: 359-393.
- <sup>16</sup> Benz, R. and K. Bauer (1988). "Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins." Eur J Biochem **176**(1): 1-19.
- <sup>17</sup> Nikaido, H. and E. Y. Rosenberg (1983). "Porin channels in *Escherichia coli*: studies with liposomes reconstituted from purified proteins." J Bacteriol **153**(1): 241-252.
- <sup>18</sup> Sonntag, I., H. Schwarz, et al. (1978). "Cell envelope and shape of *Escherichia coli*: multiple mutants missing the outer membrane lipoprotein and other major outer membrane proteins." J Bacteriol **136**(1): 280-285.
- <sup>19</sup> Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 593-656.
- <sup>20</sup> Brunen, M. and H. Engelhardt (1993). "Asymmetry of orientation and voltage gating of the *Acidovorax delafieldii* porin Omp34 in lipid bilayers." Eur J Biochem **212**(1): 129-135.
- <sup>21</sup> Nikaido, H. (2003). "Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited." Microbiol Mol Biol Rev **67**(4): 593-656.
- <sup>22</sup> Delcour, A. H. (2003). "Solute uptake through general porins." Front Biosci **8**: d1055-1071.
- <sup>23</sup> Schmid, K., R. Ebner, et al. (1991). "A sugar-specific porin, ScrY, is involved in sucrose uptake in enteric bacteria." Mol Microbiol **5**(4): 941-950.
- <sup>24</sup> Postma, P. W., J. W. Lengeler, et al. (1993). "Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria." Microbiol Rev **57**(3): 543-594.

- 
- <sup>25</sup> Raetz, C. R. and C. Whitfield (2002). "Lipopolysaccharide endotoxins." Annu Rev Biochem **71**: 635-700.
- <sup>26</sup> Walther, D. M., D. Rapaport, et al. (2009). "Biogenesis of beta-barrel membrane proteins in bacteria and eukaryotes: evolutionary conservation and divergence." Cell Mol Life Sci **66**(17): 2789-2804.
- <sup>27</sup> Papanikou, E., S. Karamanou, et al. (2007). "Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine." Nat Rev Microbiol **5**(11): 839-851.
- <sup>28</sup> Chen, R. and U. Henning (1996). "A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins." Mol Microbiol **19**(6): 1287-1294.
- <sup>29</sup> Schafer, U., K. Beck, et al. (1999). "Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins." J Biol Chem **274**(35): 24567-24574.
- <sup>30</sup> Lazar, S. W. and R. Kolter (1996). "SurA assists the folding of *Escherichia coli* outer membrane proteins." J Bacteriol **178**(6): 1770-1773.
- <sup>31</sup> Bitto, E. and D. B. McKay (2003). "The periplasmic molecular chaperone protein SurA binds a peptide motif that is characteristic of integral outer membrane proteins." J Biol Chem **278**(49): 49316-49322.
- <sup>32</sup> Bredemeier, R., T. Schlegel, et al. (2007). "Functional and phylogenetic properties of the pore-forming beta-barrel transporters of the Omp85 family." J Biol Chem **282**(3): 1882-1890.
- <sup>33</sup> Wu, T., J. Malinverni, et al. (2005). "Identification of a multicomponent complex required for outer membrane biogenesis in *Escherichia coli*." Cell **121**(2): 235-245.
- <sup>34</sup> Ficht, T. A., S. W. Bearden, et al. (1988). "A 36-kilodalton *Brucella abortus* cell envelope protein is encoded by repeated sequences closely linked in the genomic DNA." Infect Immun **56**(8): 2036-2046.
- <sup>35</sup> Cloeckert, A., N. Vizcaino, et al. (2002). "Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future." Vet Microbiol **90**(1-4): 229-247.
- <sup>36</sup> Ficht, T. A., S. W. Bearden, et al. (1989). "DNA sequence and expression of the 36-kilodalton outer membrane protein gene of *Brucella abortus*." Infect Immun **57**(11): 3281-3291.
- <sup>37</sup> Marquis, H. and T. A. Ficht (1993). "The omp2 gene locus of *Brucella abortus* encodes two homologous outer membrane proteins with properties characteristic of bacterial porins." Infect Immun **61**(9): 3785-3790.
- <sup>38</sup> Mobasher, H., T. A. Ficht, et al. (1997). "*Brucella* Omp2a and Omp2b porins: single channel measurements and topology prediction." FEMS Microbiol Lett **155**(1): 23-30.
- <sup>39</sup> Paquet, J. Y., C. Vinals, et al. (2000). "Topology prediction of *Brucella abortus* Omp2b and Omp2a porins after critical assessment of transmembrane beta strands prediction by several secondary structure prediction methods." J Biomol Struct Dyn **17**(4): 747-757.
- <sup>40</sup> Paquet, J. Y., M. A. Diaz, et al. (2001). "Molecular, antigenic, and functional analyses of Omp2b porin size variants of *Brucella* spp." J Bacteriol **183**(16): 4839-4847.
- <sup>41</sup> Douglas, J. T., E. Y. Rosenberg, et al. (1984). "Porins of *Brucella* species." Infect Immun **44**(1): 16-21.
- <sup>42</sup> Laage, R. and D. Langosch (2001). "Strategies for prokaryotic expression of eukaryotic membrane proteins." Traffic **2**(2): 99-104.
- <sup>43</sup> Villaverde, A. and M. M. Carrio (2003). "Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies." Biotechnol Lett **25**(17): 1385-1395.
- <sup>44</sup> Georgiou, G. and P. Valax (1999). "Isolating inclusion bodies from bacteria." Methods Enzymol **309**: 48-58.
- <sup>45</sup> Rinas, U. and J. E. Bailey (1992). "Protein compositional analysis of inclusion bodies produced in recombinant *Escherichia coli*." Appl Microbiol Biotechnol **37**(5): 609-614.
- <sup>46</sup> Khan, R. H., K. B. Rao, et al. (1998). "Solubilization of recombinant ovine growth hormone with retention of native-like secondary structure and its refolding from the inclusion bodies of *Escherichia coli*." Biotechnol Prog **14**(5): 722-728.

- 
- <sup>47</sup> Speed, M. A., D. I. Wang, et al. (1996). "Specific aggregation of partially folded polypeptide chains: the molecular basis of inclusion body composition." Nat Biotechnol **14**(10): 1283-1287.
- <sup>48</sup> Buchanan, S. K. (1999). "Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding." Curr Opin Struct Biol **9**(4): 455-461.
- <sup>49</sup> le Maire, M., P. Champeil, et al. (2000). "Interaction of membrane proteins and lipids with solubilizing detergents." Biochim Biophys Acta **1508**(1-2): 86-111.
- <sup>50</sup> Seddon, A. M., P. Curnow, et al. (2004). "Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera." Biochim Biophys Acta **1666**(1-2): 105-117.
- <sup>51</sup> VanAken, T., S. Foxall-VanAken, et al. (1986). "Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins." Methods Enzymol **125**: 27-35.
- <sup>52</sup> Sardet, C., A. Tardieu, et al. (1976). "Shape and size of bovine rhodopsin: a small-angle x-ray scattering study of a rhodopsin-detergent complex." J Mol Biol **105**(3): 383-407.
- <sup>53</sup> Schweizer, M., I. Hindennach, et al. (1978). "Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Interaction of protein II with lipopolysaccharide." Eur J Biochem **82**(1): 211-217.
- <sup>54</sup> Dornmair, K., H. Kiefer, et al. (1990). "Refolding of an integral membrane protein. OmpA of Escherichia coli." J Biol Chem **265**(31): 18907-18911.
- <sup>55</sup> Anfinsen, C. B. (1973). "Principles that govern the folding of protein chains." Science **181**(96): 223-230.
- <sup>56</sup> Li, M., Z. G. Su, et al. (2004). "In vitro protein refolding by chromatographic procedures." Protein Expr Purif **33**(1): 1-10.
- <sup>57</sup> Eisele, J. L. and J. P. Rosenbusch (1990). "In vitro folding and oligomerization of a membrane protein. Transition of bacterial porin from random coil to native conformation." J Biol Chem **265**(18): 10217-10220.
- <sup>58</sup> Hofmann, A., M. Tai, et al. (1995). "A sparse matrix screen to establish initial conditions for protein renaturation." Anal Biochem **230**(1): 8-15.
- <sup>59</sup> Builder, S. and J.R. Ogez (1986). « Purification and activity assurance of precipitated heterologous proteins. » US Patent **4** : 620-684.
- <sup>60</sup> Prive, G. G., G. E. Verner, et al. (1994). "Fusion proteins as tools for crystallization: the lactose permease from Escherichia coli." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **50**(Pt 4): 375-379.
- <sup>61</sup> Ostermeier, C. and H. Michel (1997). "Crystallization of membrane proteins." Curr Opin Struct Biol **7**(5): 697-701.
- <sup>62</sup> Pebay-Peyroula, E., R. M. Garavito, et al. (1995). "Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin." Structure **3**(10): 1051-1059.
- <sup>63</sup> Pebay-Peyroula, E., R. M. Garavito, et al. (1995). "Detergent structure in tetragonal crystals of OmpF porin." Structure **3**(10): 1051-1059.
- <sup>64</sup> Garavito, R. M., J. Jenkins, et al. (1983). "X-ray diffraction analysis of matrix porin, an integral membrane protein from Escherichia coli outer membranes." J Mol Biol **164**(2): 313-327.
- <sup>65</sup> Garavito, R. M. and J. P. Rosenbusch (1986). "Isolation and crystallization of bacterial porin." Methods Enzymol **125**: 309-328.
- <sup>66</sup> Smith, B. S., B. Kobe, et al. (1998). "Crystallization and preliminary X-ray analysis of ferric enterobactin receptor FepA, an integral membrane protein from Escherichia coli." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **54**(Pt 4): 697-699.
- <sup>67</sup> Baelen, S. (2009). « Production et purification de trois classes de protéines majeures de la membrane externe (OMPs majeures) de *Brucella* en vue de leur caractérisation structurale. » FUNDP.
- <sup>68</sup> Jungbauer, A. and W. Kaar (2007). "Current status of technical protein refolding." J Biotechnol **128**(3): 587-596.
- <sup>69</sup> Michaux, C., N. C. Pomroy, et al. (2008). "Refolding SDS-denatured proteins by the addition of amphipathic cosolvents." J Mol Biol **375**(5): 1477-1488.

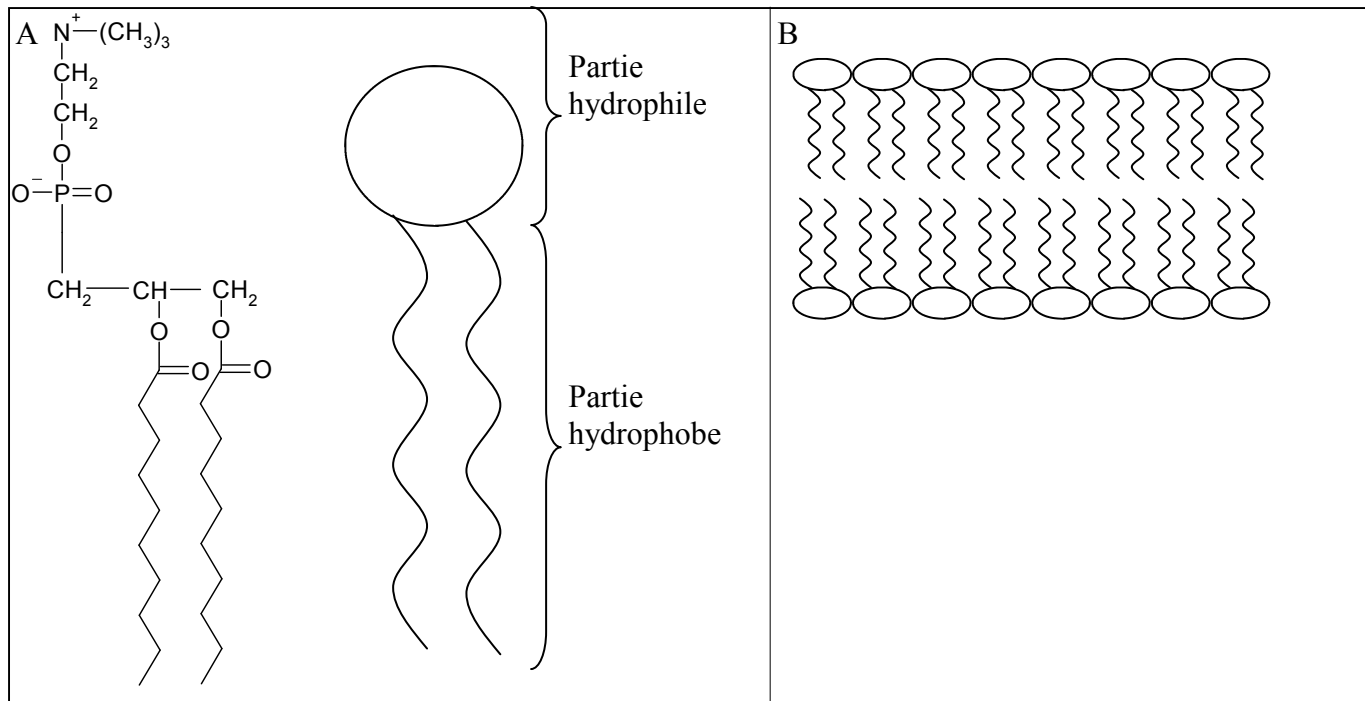
- 
- <sup>70</sup> Stulik, K., V. Pacakova, et al. (2003). "Some potentialities and drawbacks of contemporary size-exclusion chromatography." J Biochem Biophys Methods **56**(1-3): 1-13.
- <sup>71</sup> Kunji, E. R., M. Harding, et al. (2008). "Determination of the molecular mass and dimensions of membrane proteins by size exclusion chromatography." Methods **46**(2): 62-72.
- <sup>72</sup> Weiss, M. S., U. Abele, et al. (1991). "Molecular architecture and electrostatic properties of a bacterial porin." Science **254**(5038): 1627-1630.
- <sup>73</sup> Gabriel, M. and A. Zentner (2005). "Sodium dodecyl sulfate agarose gel electrophoresis and electroelution of high molecular weight human salivary mucin." Clin Oral Investig **9**(4): 284-286.
- <sup>74</sup> Jorgensen, C. S., M. Jagd, et al. (2004). "Efficacy and compatibility with mass spectrometry of methods for elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels and polyvinylidene difluoride membranes." Anal Biochem **330**(1): 87-97.
- <sup>75</sup> Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- <sup>76</sup> Schweizer, M., I. Hindennach, et al. (1978). "Major proteins of the Escherichia coli outer cell envelope membrane. Interaction of protein II with lipopolysaccharide." Eur J Biochem **82**(1): 211-217.
- <sup>77</sup> Puntervoll, P., M. Ruud, et al. (2002). "Structural characterization of the fusobacterial non-specific porin FomA suggests a 14-stranded topology, unlike the classical porins." Microbiology **148**(Pt 11): 3395-3403.



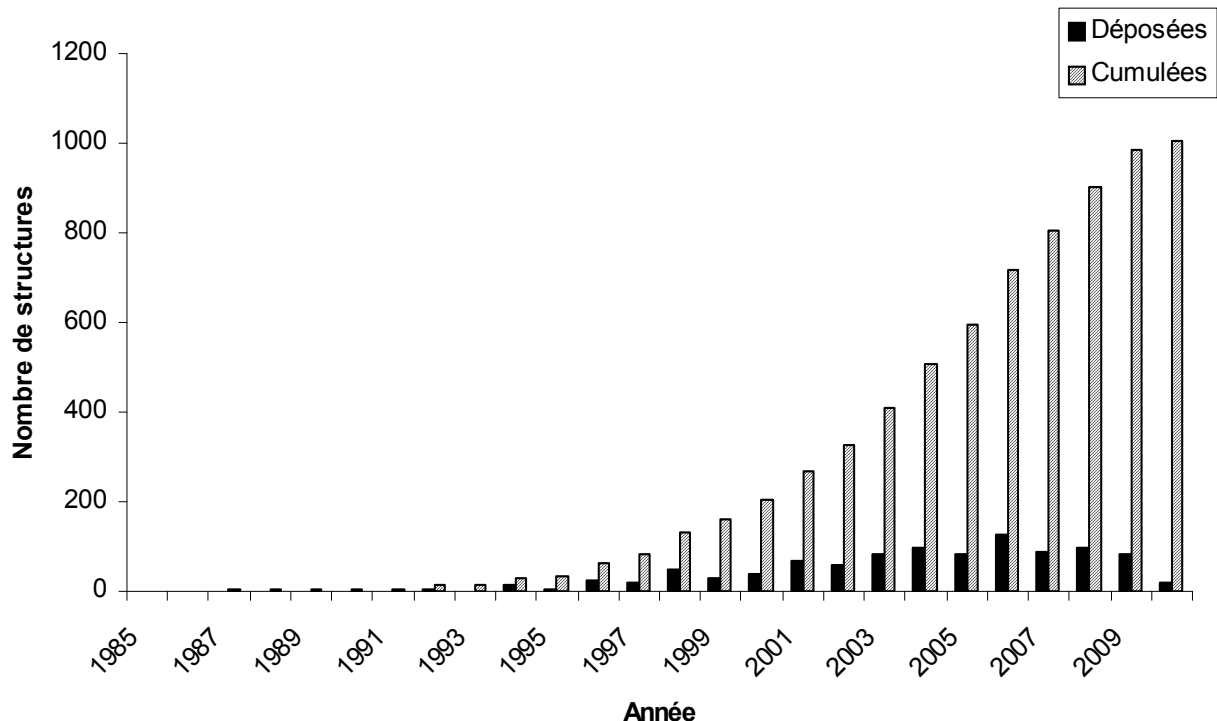






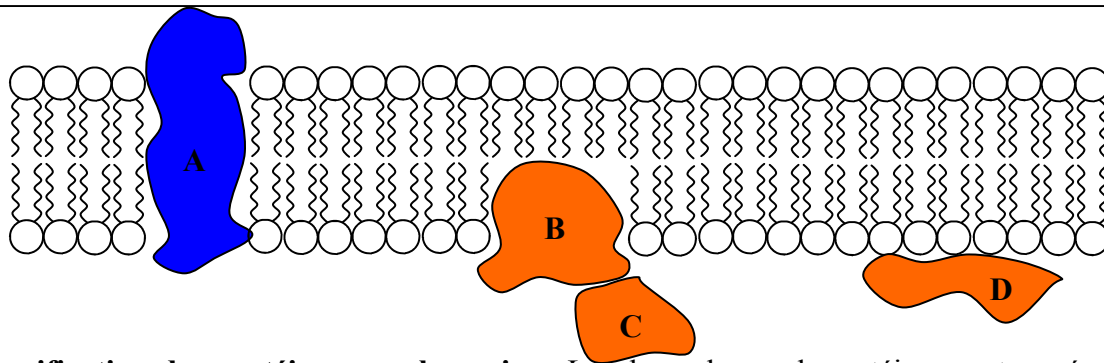


**Figure 1: La bicouche lipidique.** (A) Représentation détaillée (gauche) et schématique (droite) de la phosphatidyl Choline. L'élément central, le glycérol, porte d'un côté un groupement phosphate et une choline, constituant la tête polaire et de l'autre, deux chaînes d'hydrocarbures hydrophobes. (B) Représentation schématique d'une bicouche lipidique. Les têtes hydrophiles font face au milieu aqueux tandis que les queues hydrophobes se font face, évitant le contact avec l'eau.

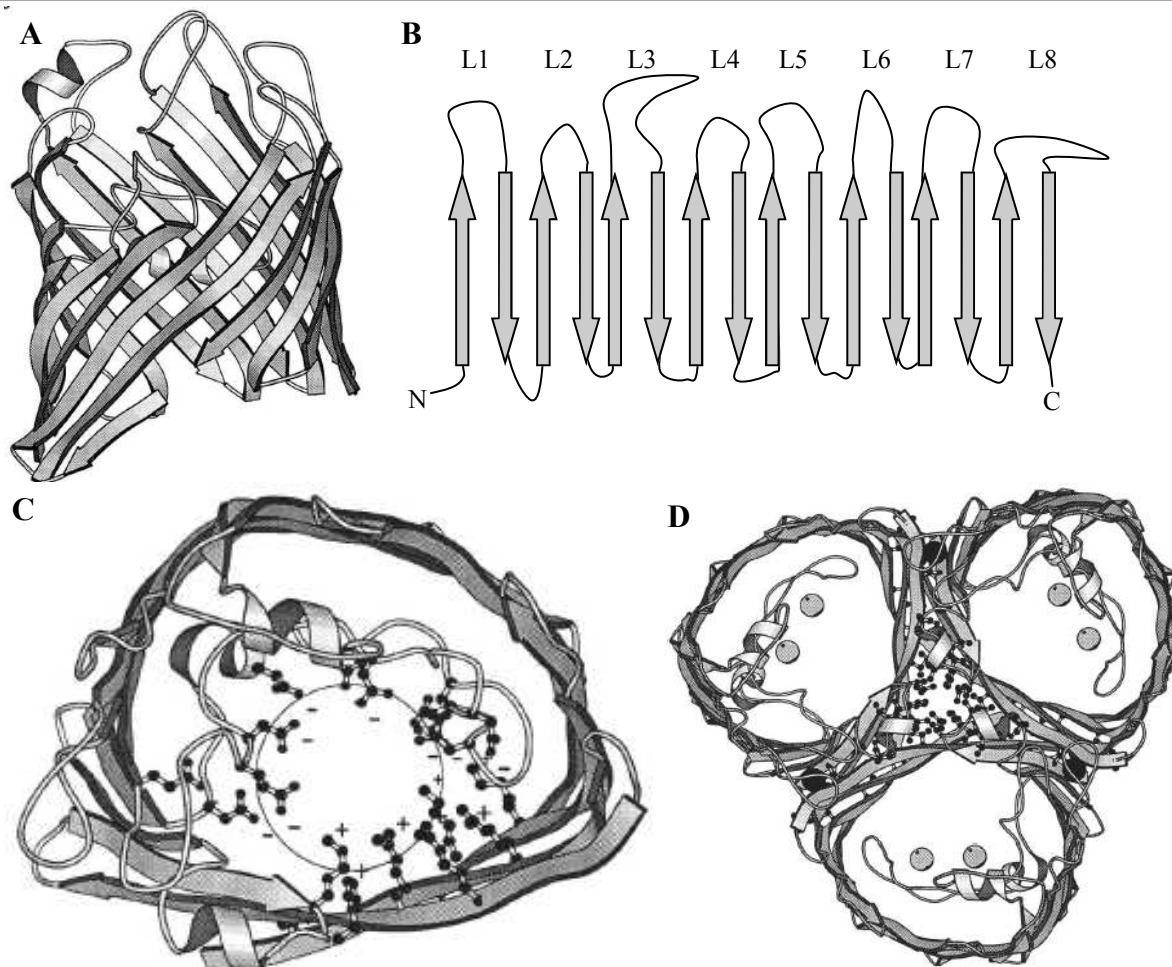


**Figure 2: Evolution du nombre de protéines membranaires dont la structure tridimensionnelle est connue et répertoriée dans la « Membrane protein data bank ».** L'énumération commence en 1985 avec la première structure de protéines membranaires publiée: le centre de réaction photosynthétique de la bactérie *Rhodospseudomonas viridis*. L'historique représenté ici suit soit le nombre croissant de structure unique de protéine, soit le nombre de structures déposées.

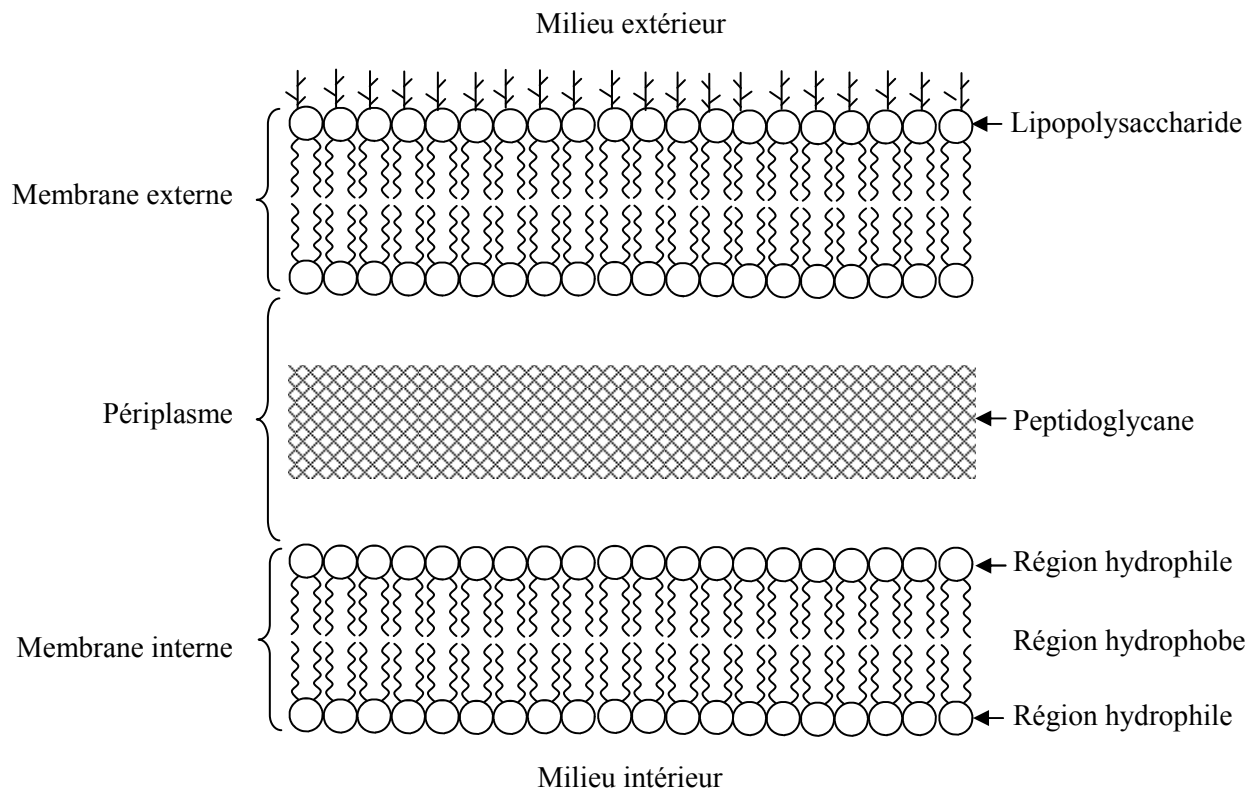
Selon le site de « Membrane protein data bank »



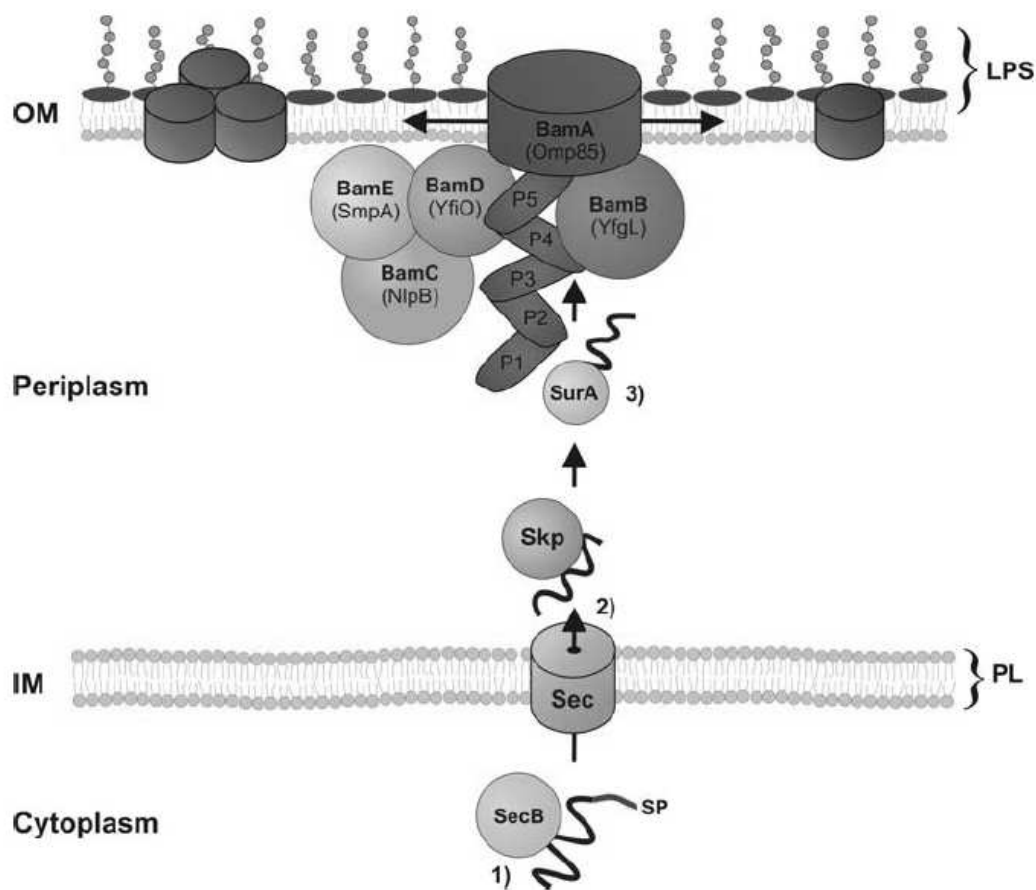
**Figure 3: Classification des protéines membranaires.** Les deux classes de protéines sont représentées par deux couleurs différentes. En bleu (A), un exemple de protéine intrinsèque ou polytopique. La protéine traverse la membrane et est donc en contact avec les deux compartiments créés par la membrane. En orange, les protéines extrinsèques ou monotopiques. (B) Protéine extrinsèque interagissant avec la membrane via un domaine hydrophobe. (C) Protéine extrinsèque périphérique interagissant indirectement avec la membrane via des contacts hydrophobes ou non avec une autre protéine extrinsèque intégrée. (D) Protéine extrinsèque périphérique interagissant avec la membrane via des interactions covalentes ou ioniques.



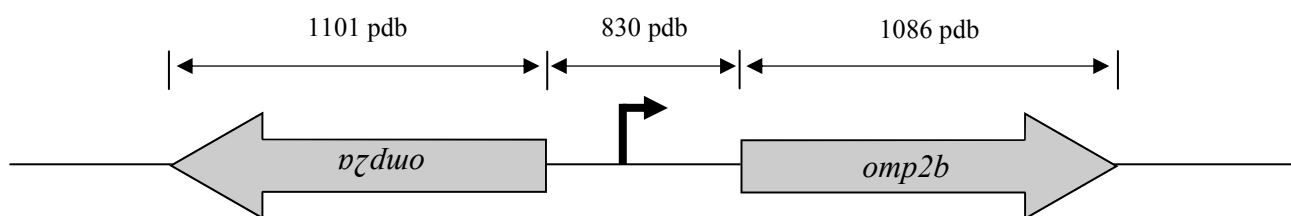
**Figure 4: Représentation tridimensionnelle en ruban d'une porine de *Rhodobacter capsulatus*.** (A) Représentation générale d'un tonneau  $\beta$  formant un monomère de porine. Les brins  $\beta$  sont représentés par des flèches grises. On y observe l'orientation antiparallèle des différents brins (sens des flèches) ainsi que leur inclinaison proche de  $45^\circ$ . (B) Représentation de la forme déroulée d'un tonneau  $\beta$  à 16 brins  $\beta$ , les flèches grises représentent les brins ainsi que leur orientation. (C) Représentation de la lumière d'un tonneau  $\beta$ . Le repliement de la boucle L3 induit un rétrécissement du diamètre du pore. De plus, la proximité de plusieurs résidus chargés induit un environnement permettant le passage de molécules hydrophiles. (D) Représentation d'un trimère en tonneau  $\beta$ . Les trois sous-unités s'assemblent grâce à des contacts hydrophobes entre les résidus de l'interface protéine/protéine.



**Figure 5: Enveloppe d'une bactérie Gram-négative.** L'enveloppe d'une bactérie Gram-négative est constituée de deux membranes séparées par le périplasme. La membrane interne est constituée de deux feuillets de composition classique tandis que la membrane externe est asymétrique: le feuillet interne face au périplasme est de composition classique et le feuillet externe, face au milieu extérieur, est constitué de lipopolysaccharide. Le périplasme contient le peptidoglycane.



**Figure 6: Système d'insertion et de renaturation d'une porine trimérique au sein de la membrane externe bactérienne.** Les OMP sont synthétisées dans le cytoplasme comme précurseurs portant une séquence signal en position N-terminale (1). Les précurseurs sont ensuite transportés vers le périplasm à travers la membrane interne par le système de translocation Sec (2). Cette translocation est guidée par la séquence d'insertion en membrane ou peptide signal (SP). Les chaperonnes Sec B et Skp évitent la re-naturation prématurée des protéines qui mènerait à leur agrégation. Les OMP sont ensuite dirigées vers le complexe BAM inséré en membrane externe. Le complexe BAM est constitué de la protéine intégrale BAM A (Omp85) et de quatre lipoprotéines périphériques (BAM B-E). La chaperone périplasmique Sur A assiste la renaturation de l'OMP et l'association avec le complexe BAM pour enfin insérer l'OMP native dans la membrane externe (3).

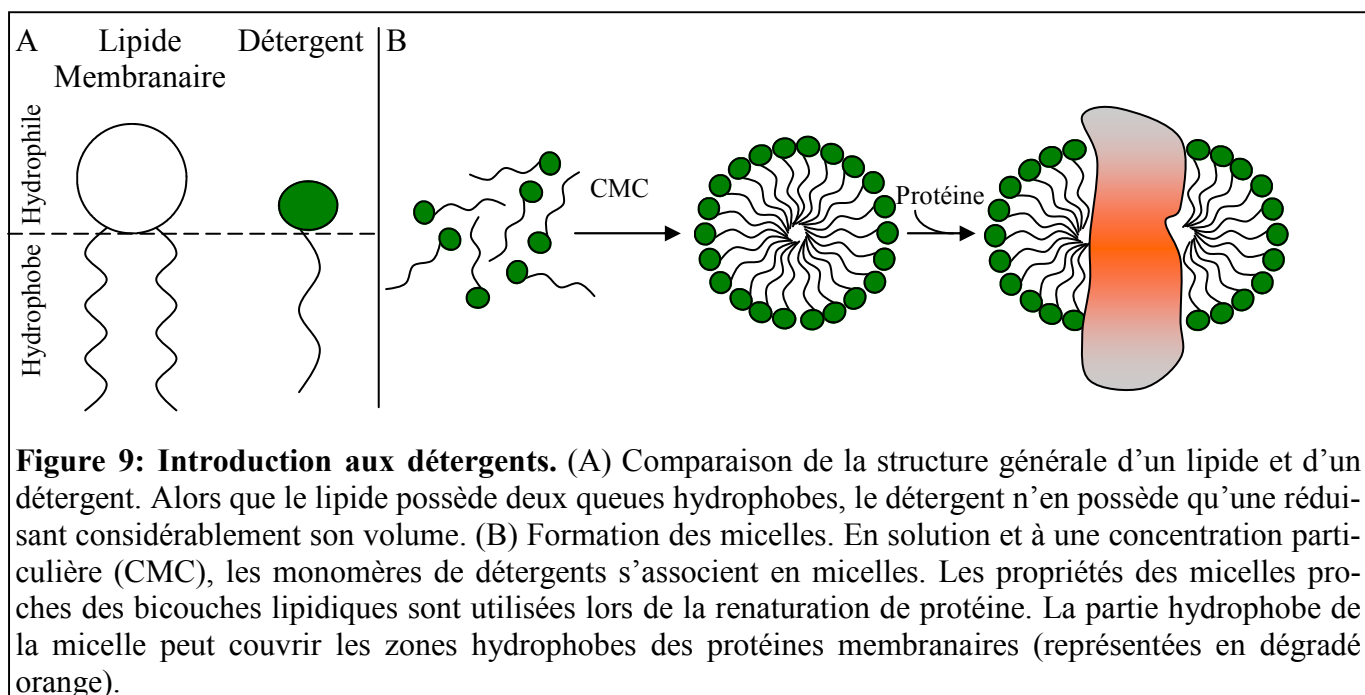


**Figure 7: Locus *omp2* de *Brucella melitensis*.** Le locus *omp2* contient deux gènes séparés (flèches grises) par une distance de 830 paires de bases. Les deux gènes sont orientés dans des directions opposées. Sur le « séparateur » se trouve le promoteur orienté vers le gène *omp2b*. Cette orientation explique qu'en conditions normales, seule l'Omp2b est produite. Il est possible de produire l'Omp2a artificiellement en inversant la région intergénique et donc l'orientation du promoteur.



Protéine	Nbre brins / oligomérique	Système d'expression	Hôte d'inclusion	Corps d'inclusion	Condition dénaturation	Condition de renaturation	Obtention cristal
OmpF	16/3	Chromosomal	<i>E. coli</i>	No	6 M guanidine plus 95°C, then exchange into 2% SDS	Dilution into mixed micelles (asolectin plus C8-POE), dialysis	No
OmpF	16/3	Chromosomal	<i>E. coli</i>	No	8 M urea	Dilution into mixed micelles (DMPC-LM), dialysis	No
OmpA	8/1	Chromosomal	<i>E. coli</i>	No	4 M urea	Dilution into OG, reconstitution into DMPC vesicles	No
OmpA	8/1	Chromosomal	<i>E. coli</i>	No	0.05% SDS, 100°C, 10 min	Addition of OG, then reconstitution into DMPC vesicles	No
PhoE	16/3	<i>In vitro</i> synthesis	NA	No	Protein obtained unfolded	Addition of Triton X-100	No
<i>Rps. blastic</i> porin	16/3	pET3b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)- pLysS	Yes	8 M urea	Dilution into 10% LDAO, refolding on anion exchange column	Yes
OMPLA	12/2	pJP29	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	8 M urea	Dilution into 10 mM Triton X-100, 0.87 M urea, 16 hr RT	Yes
OmpA and OmpX	8/1	pET3b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	6 M guanidine	Dilution into 5% C8-POE plus 0.6 M arginine	Yes
<i>H. influenzae</i> type-b porin	16?/3	pET11a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	8 M urea	1 M NaCl plus 10% SB3-14, gel filtration chromatography to reduce detergent concentration to 0.05%, storage at 4°C for 3 weeks	No
<i>H. influenzae</i> porin	16?/3	pKTH	<i>B. subtilis</i>	Yes	8 M urea	1% SDS, 100°C, added 0.1% SB3-14	No
Neisserial porins	16?/3	pET17b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	8 M urea	5% SB3-14 plus 4M urea, gel filtration chromatography to reduce detergent concentration to 0.05%	No
FepA	22/1	pET17b	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	7 M urea	Removal of urea by dialysis, then addition of 1% SDS plus 5% SB3-14 gel filtration chromatography to reduce detergent concentration to 0.05%	Yes
<i>S. cerevisiae</i> Tom40	Unknown	pET11a	<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Yes	8 M urea	Dilution into Mega-9 or mixed micelles (asolectin plus Mega-9), dialysis	No

**Figure 8: Procédures de renaturation de protéines en tonneau  $\beta$ .** Ce tableau récapitule quelques exemples de réussites de renaturation de protéines membranaire intégrales dont la structure de base est le tonneau  $\beta$ . Pour l'ensemble des protéines reprises dans la colonne de gauche, il est possible d'obtenir la forme native en suivant les conditions de renaturation reprises dans la septième colonne. La dernière colonne indique si les essais de cristallogenèse ont été fructueux ou non.

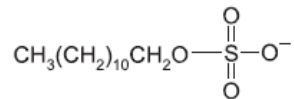




A.

### Ionic detergents

Sodium dodecyl sulfate (SDS)



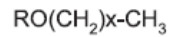
C.

### Non-Ionic Detergents

R = glucose, x = 7, n-octyl-β-D-glucopyranoside

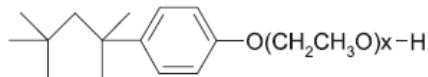
R = maltose, x = 9, decyl-β-D-maltoside

x = 11, dodecyl-β-D-maltoside



x = 9, Triton® X-100

x = 7-8, Triton® X-114

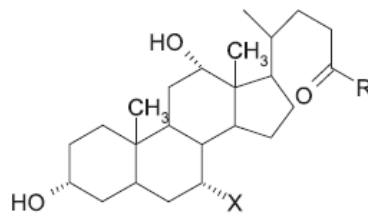


B.

### Bile Acid Salts

X=H, R = O-Na<sup>+</sup>, sodium deoxycholate

X=OH, R = O-Na<sup>+</sup>, sodium cholate

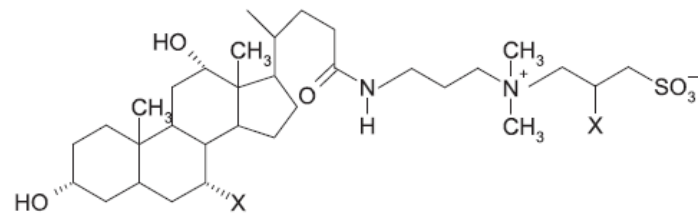


D.

### Zwitterionic Detergents

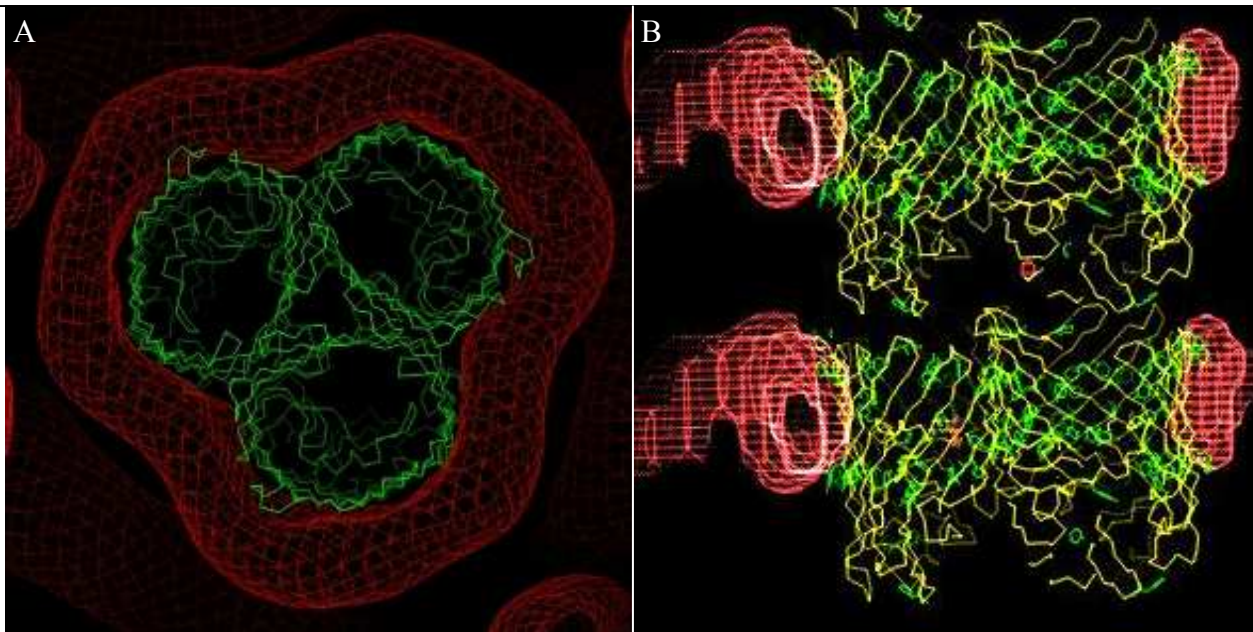
x = H, CHAPS

x = OH, CHAPSO



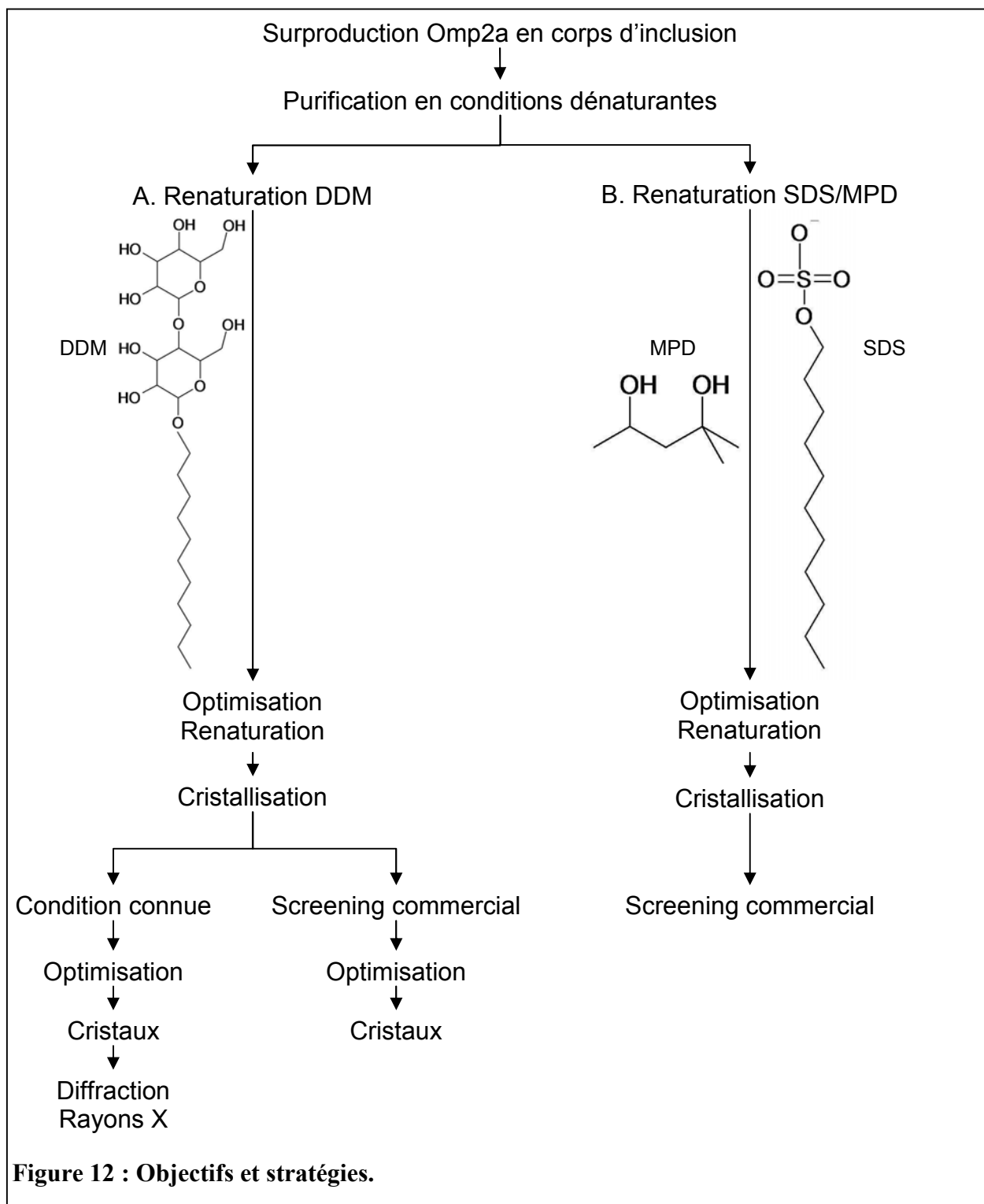
**Figure 10: Types de détergents.** La classification des détergents se fait selon leur polarité et la structure hydrophobe. Quatre classes englobent l'ensemble des détergents: (A) les ioniques (B) les sels biliaries acides (C) les détergents non-ioniques (D) les zwitterioniques.



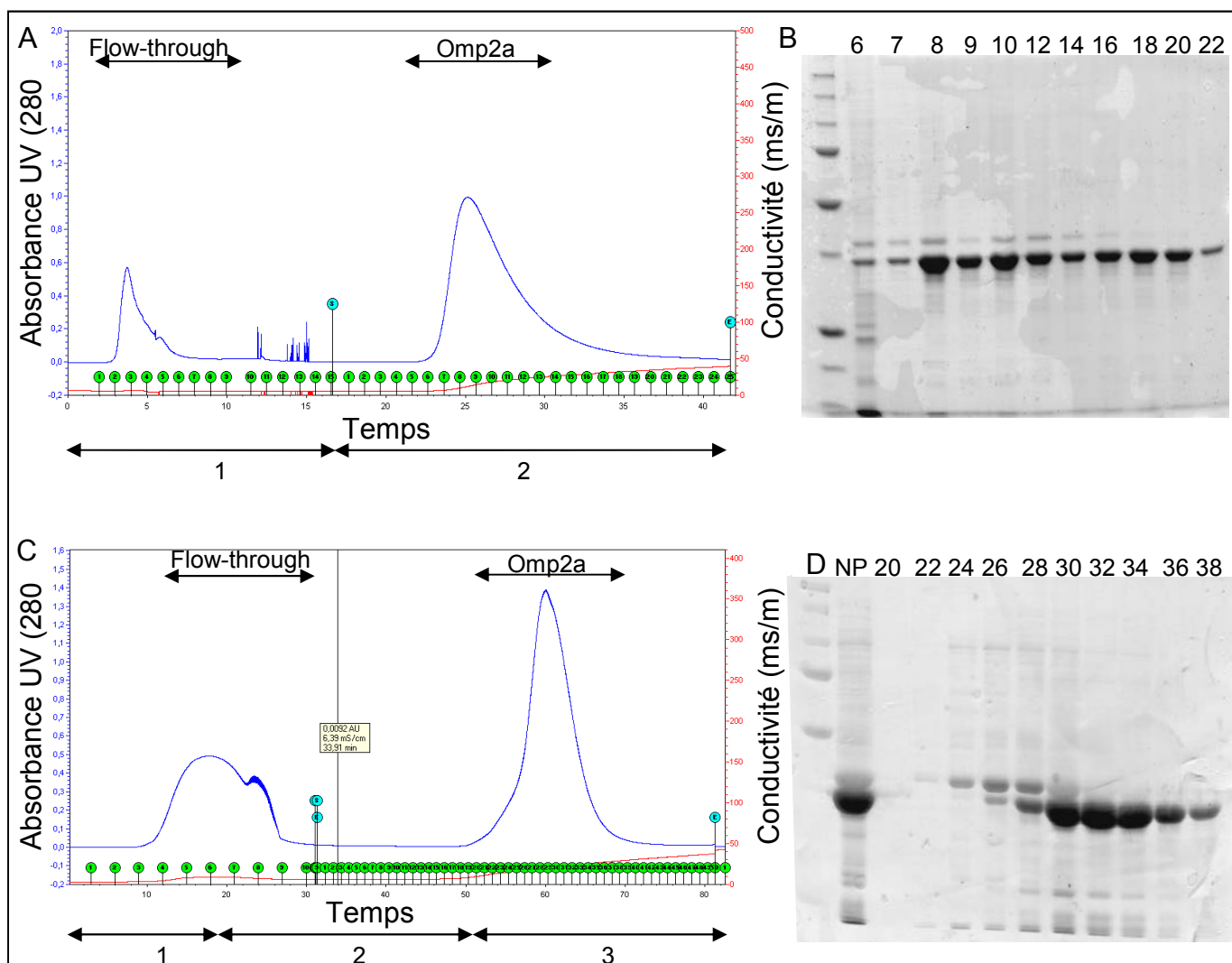
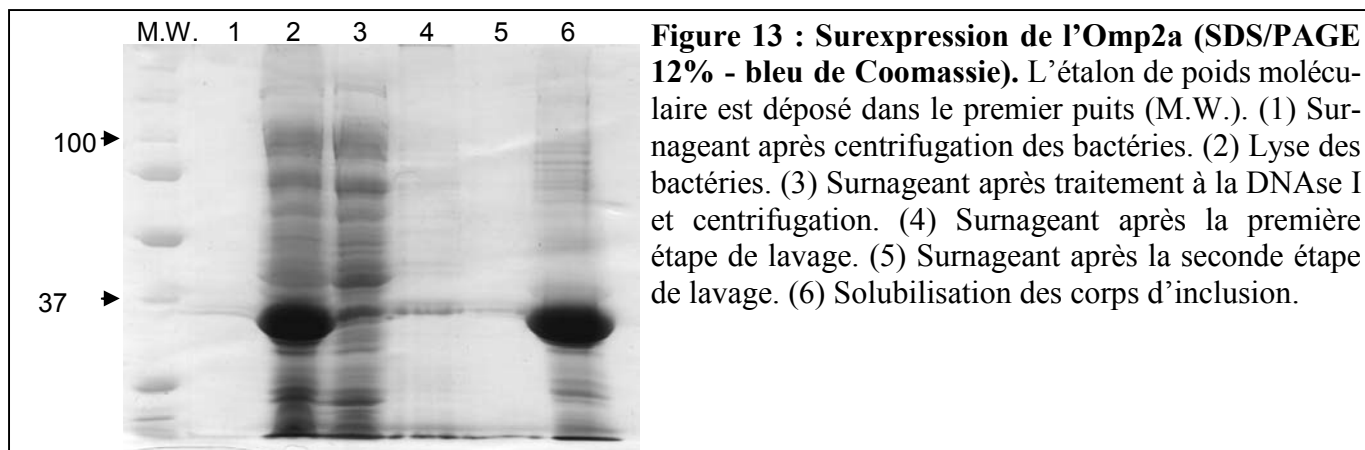


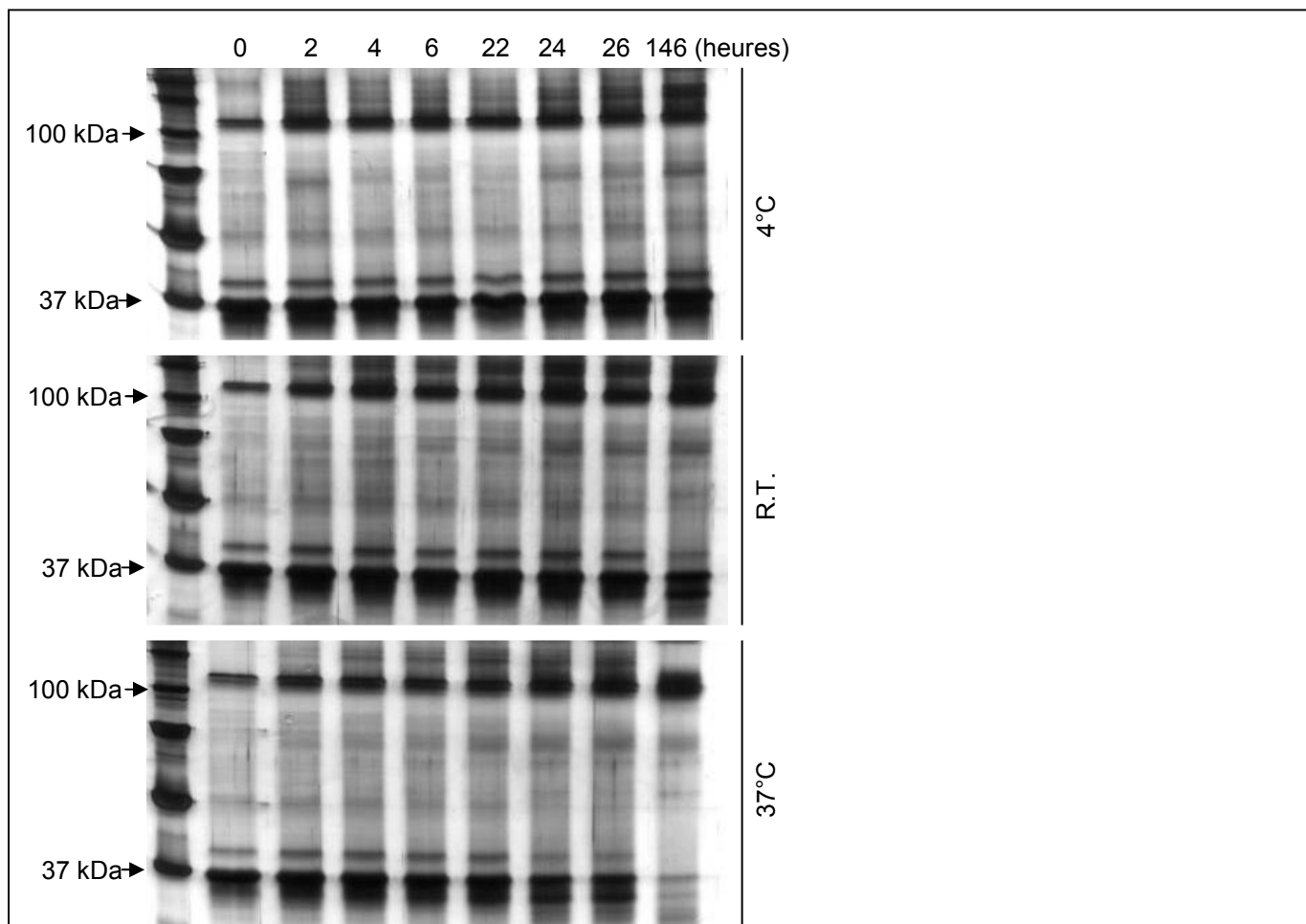
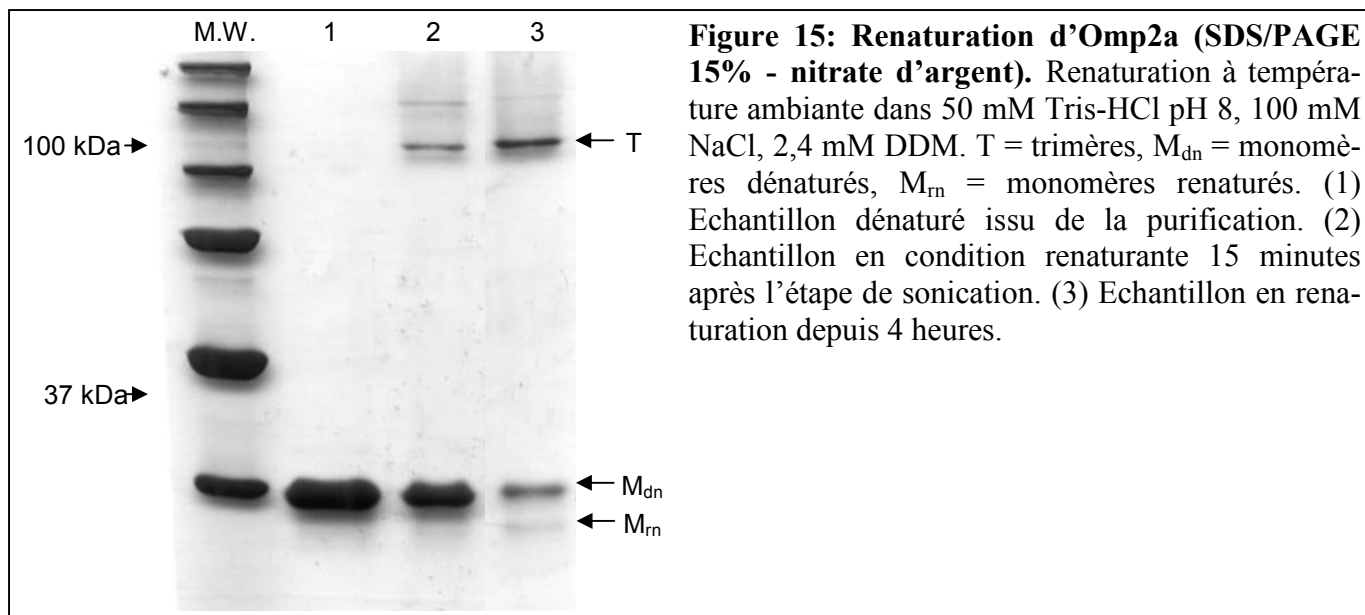
**Figure 11: Représentation de la porine OmpF d'*Escherichia coli* en présence de détergent.** En vert est représentée la porine. En rouge, représentation du détergent, ici le  $\beta$ -D-octyl glucopyranoside. (A) Vue de dessus, la porine est complètement entourée par un anneau de détergent. (B) Le détergent couvre l'entièreté des zones hydrophobes (insérée en membrane *in vivo*). Les interactions protéine-protéine sont donc possible uniquement à partir des zones hydrophiles non couvertes par le détergent.



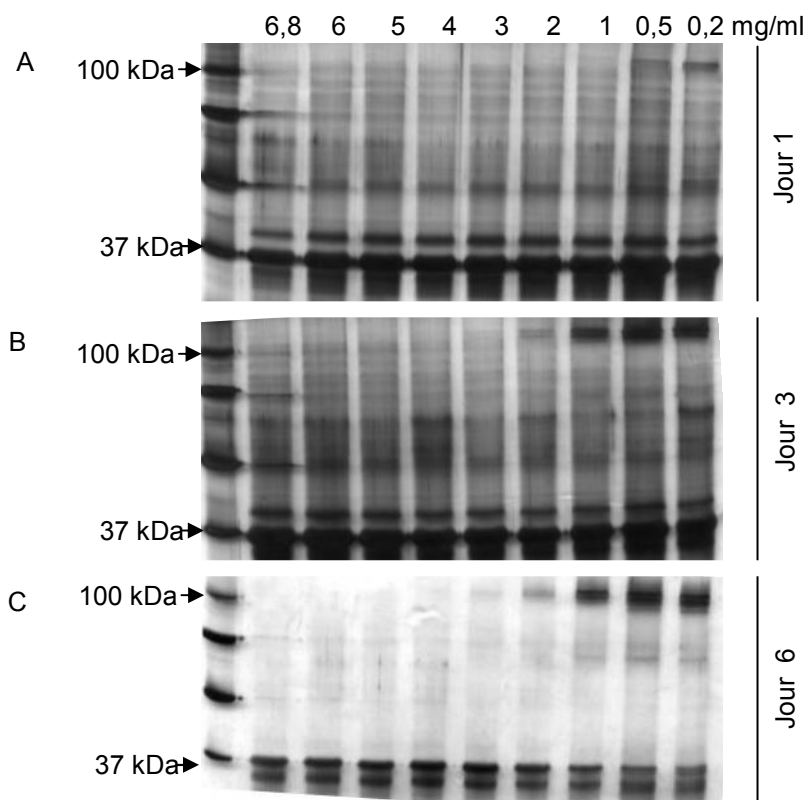




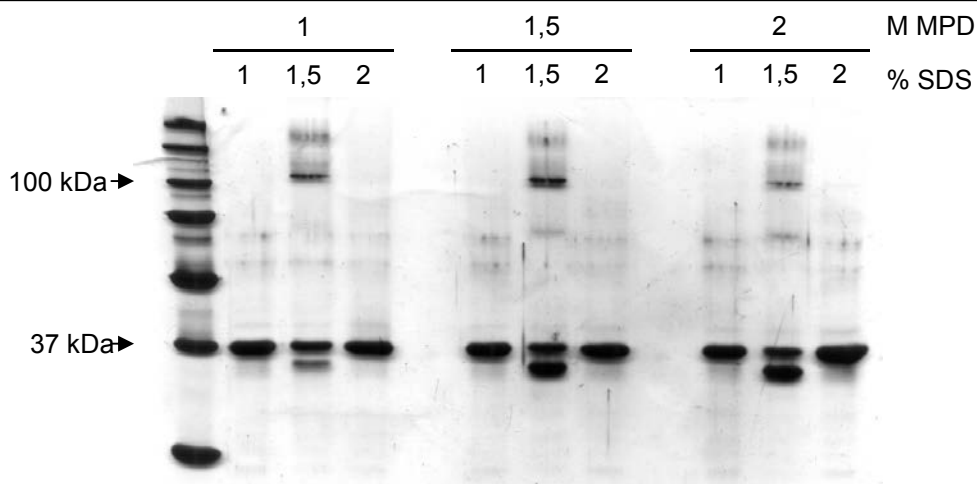




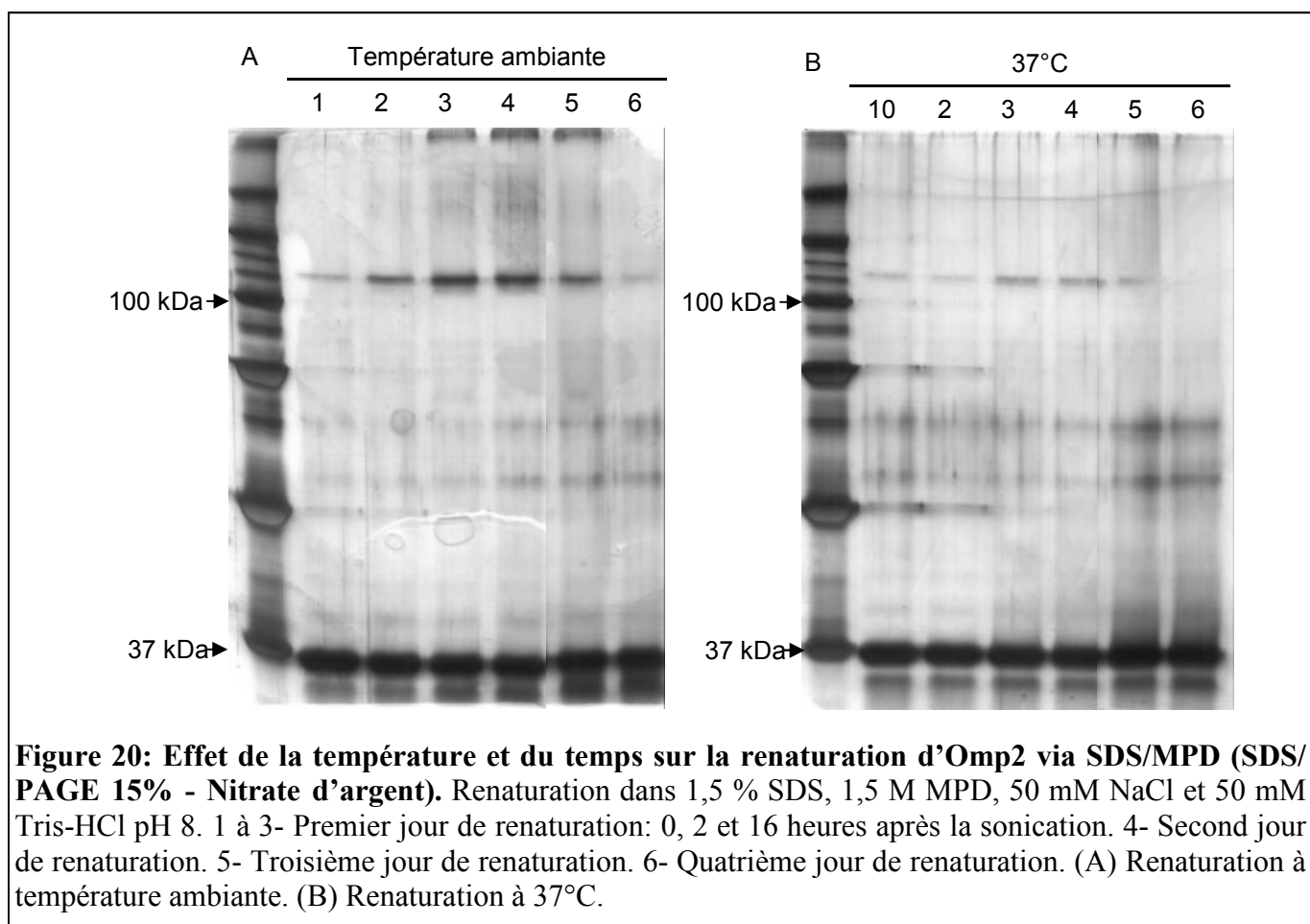
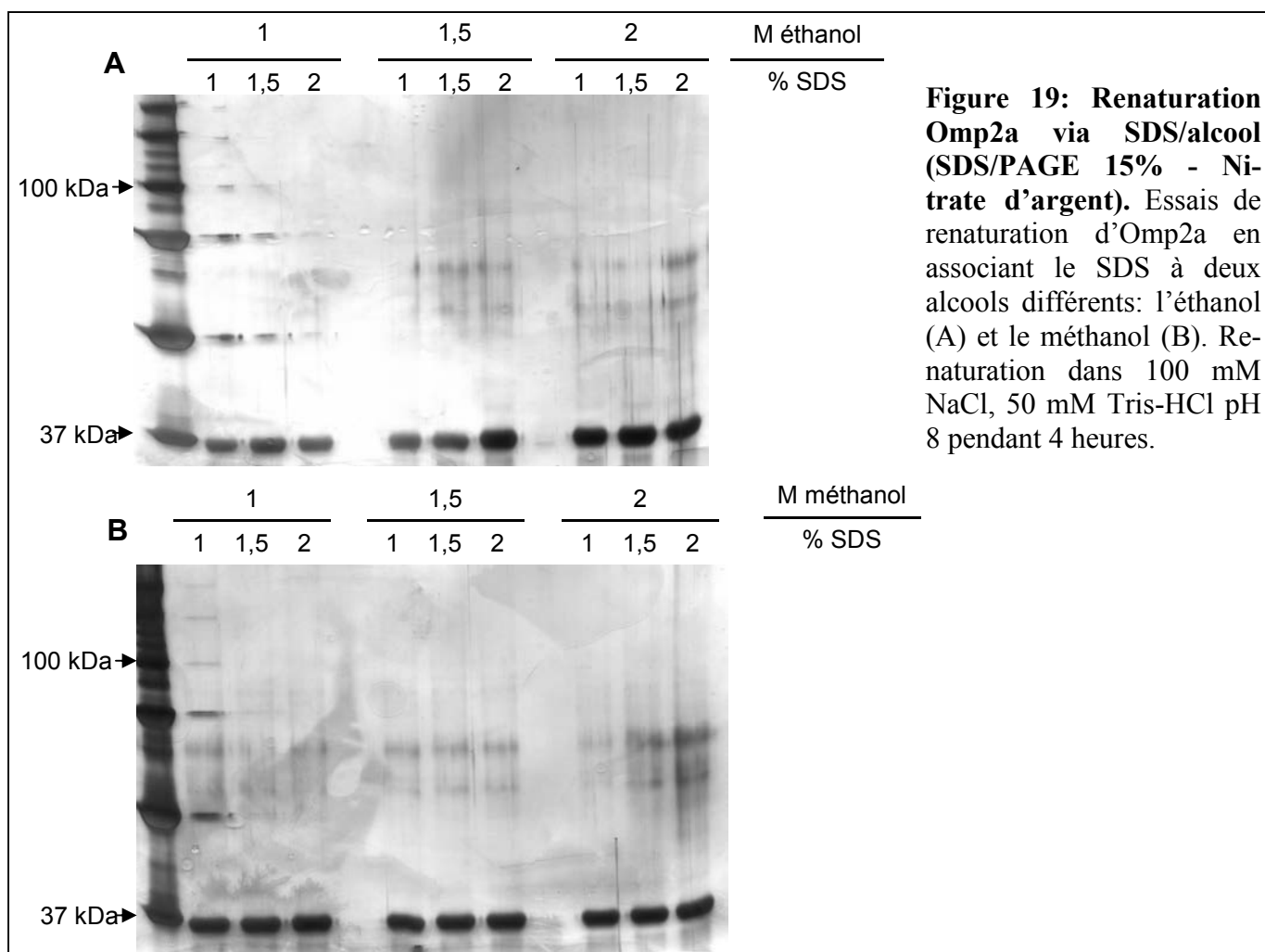


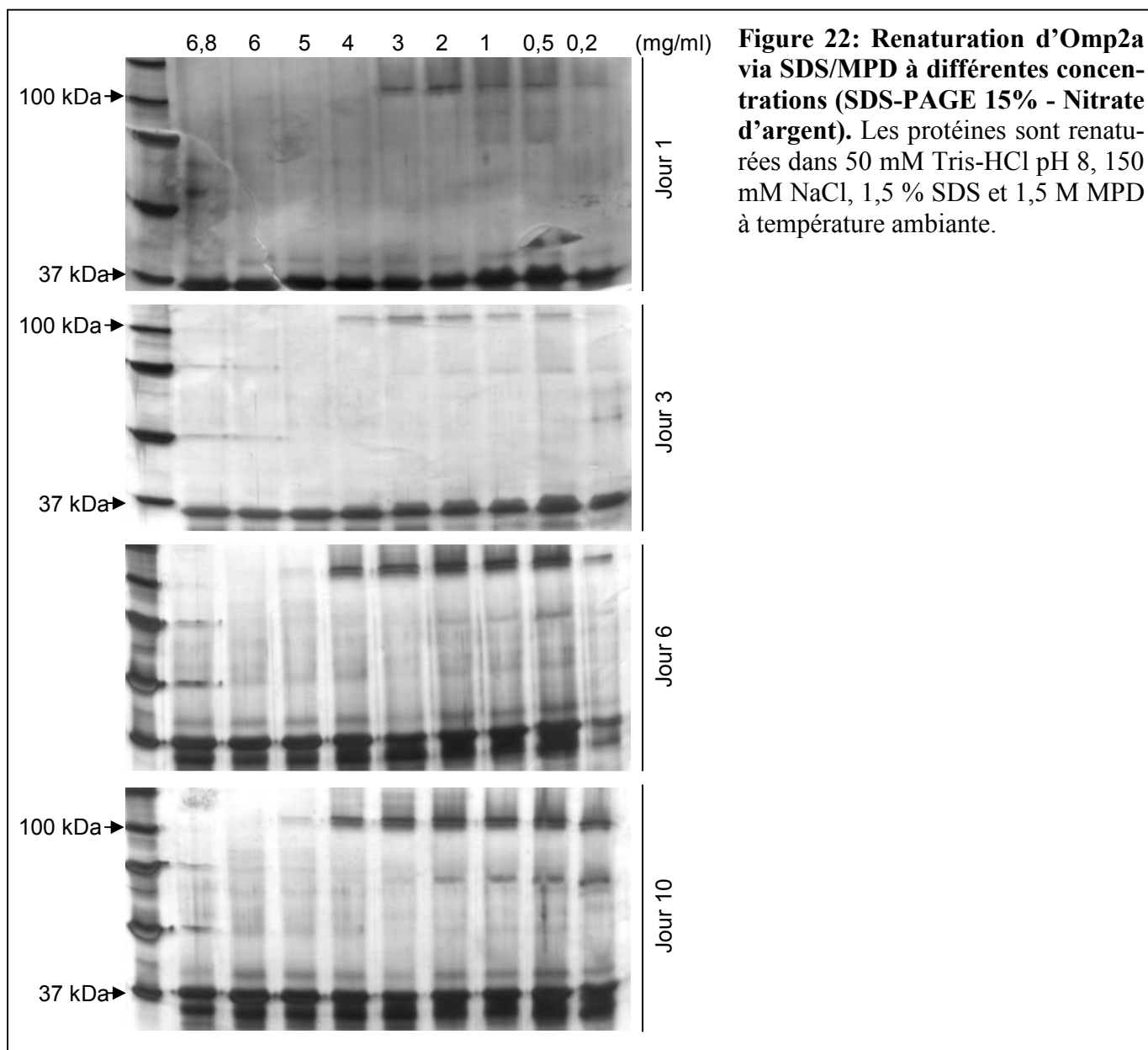
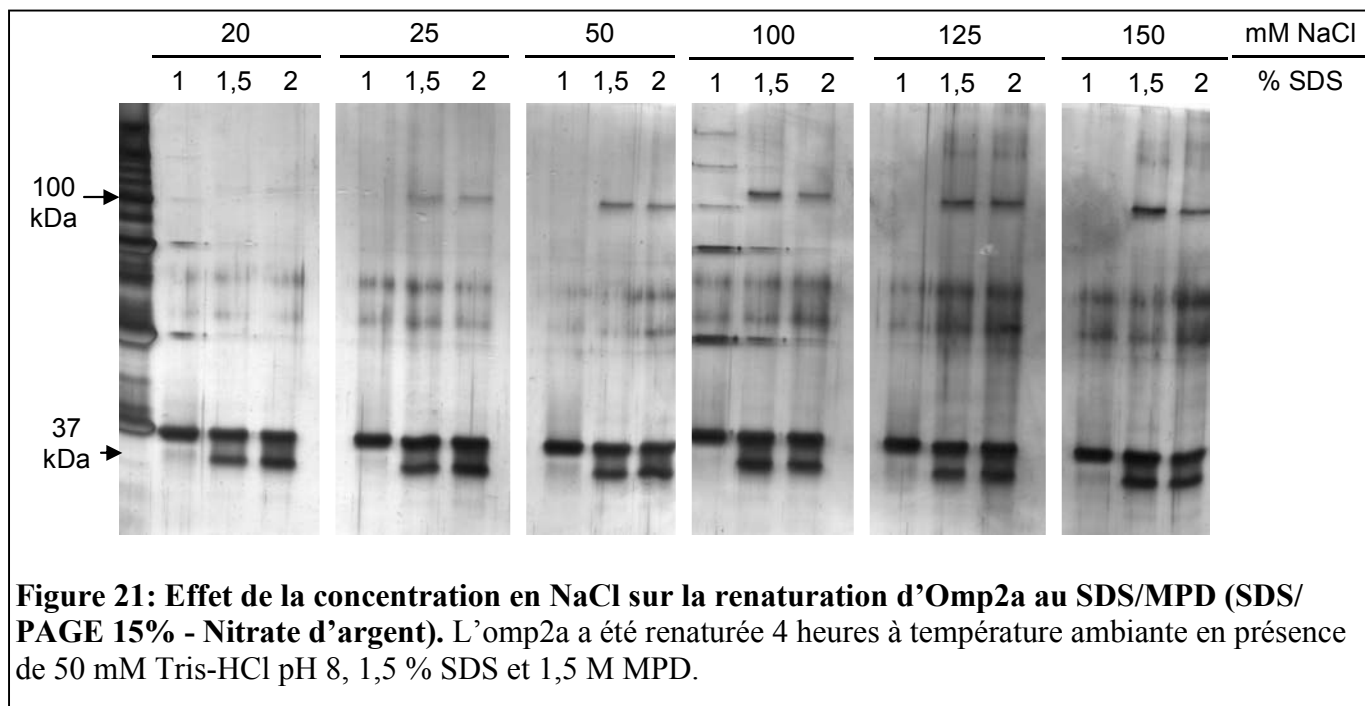


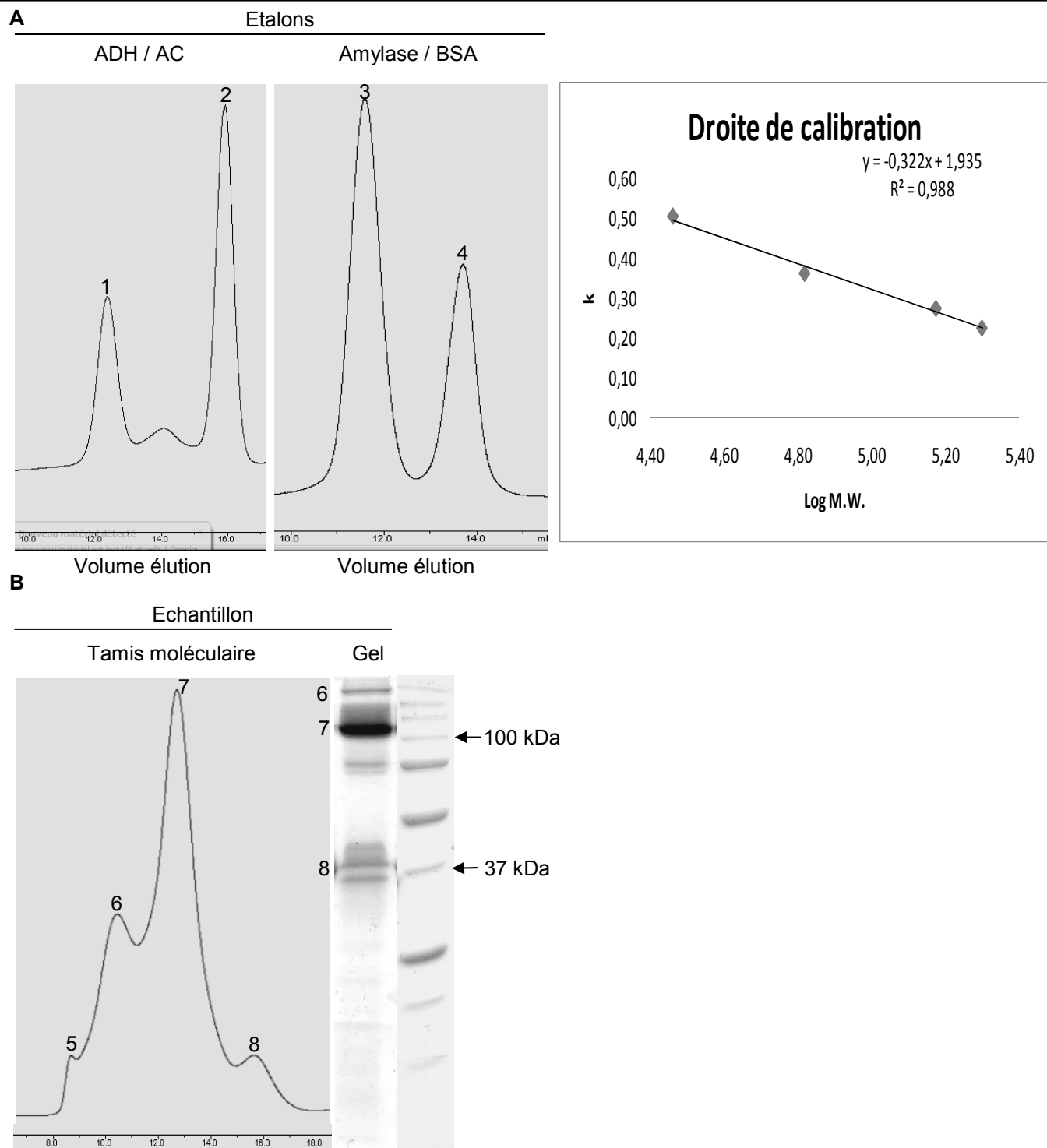
**Figure 17: Renaturation d'Omp2a au DDM à différentes concentrations (SDS/PAGE 15% - nitrate d'argent).** La concentration des échantillons correspond à celle obtenue après dilution dans le tampon de renaturation. Migration après 1 (A), 3 (B) ou 6 (C) jours de renaturation.



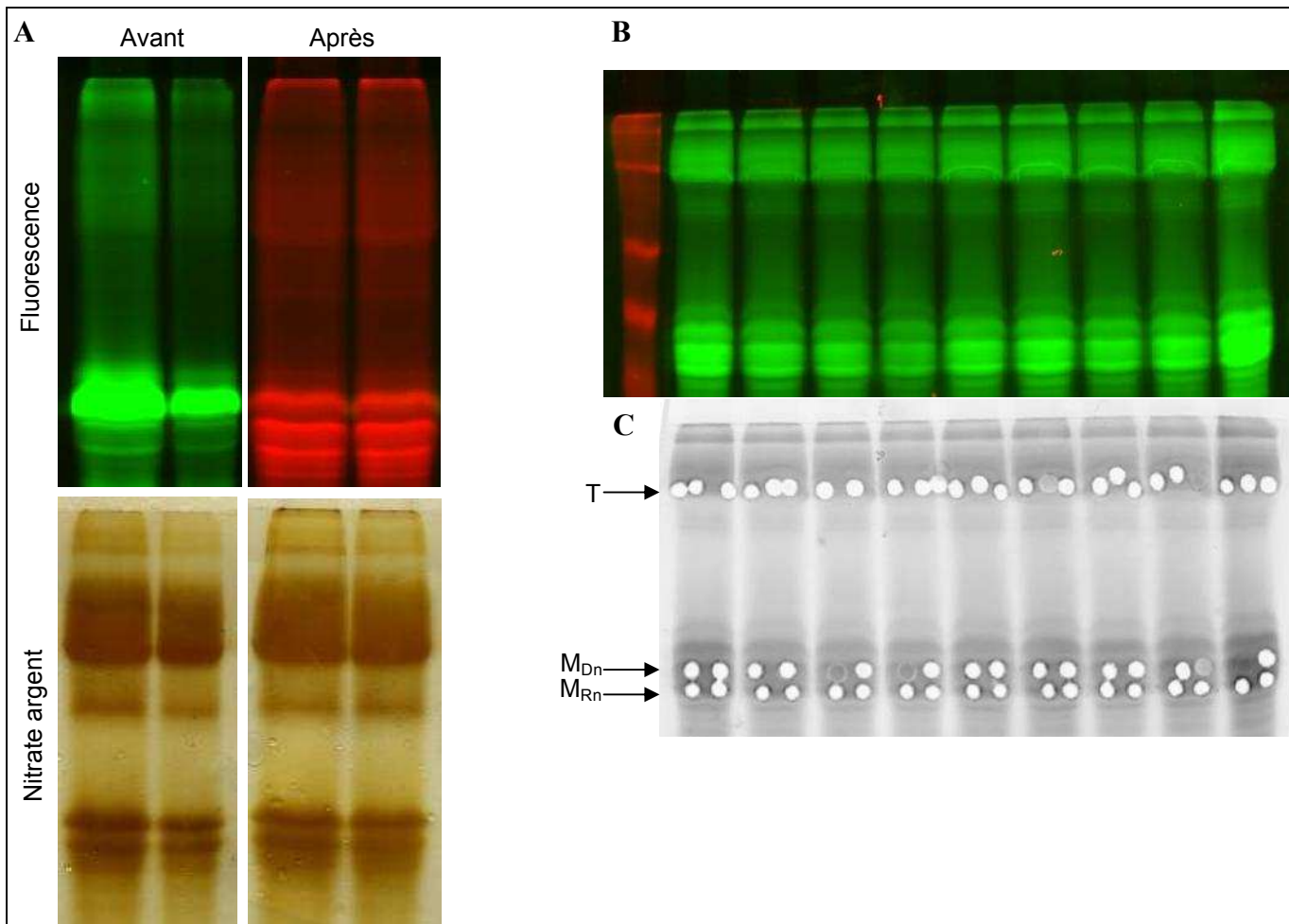
**Figure 18: Renaturation d'Omp2a via SDS/MPD (SDS/PAGE 15% - Nitrate d'argent).** Pour chaque concentration en MPD testée (1 à 2 M), trois proportions en SDS ont été appliquées. Renaturation dans 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8 pendant 4 heures (même temps que la renaturation au DDM) à 37°C.



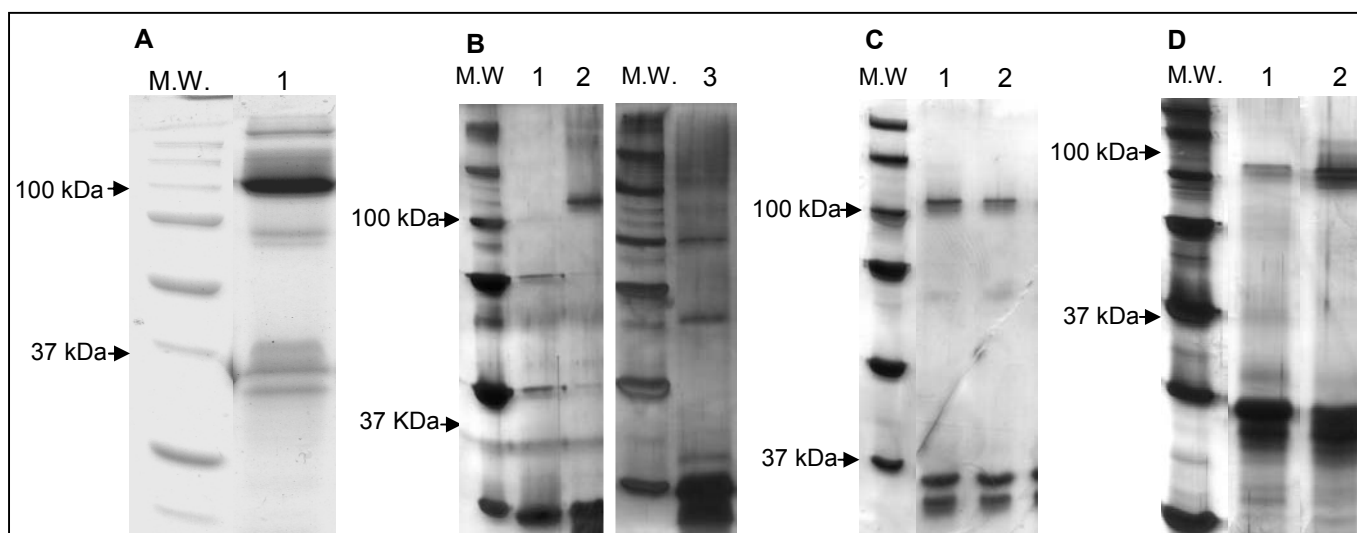
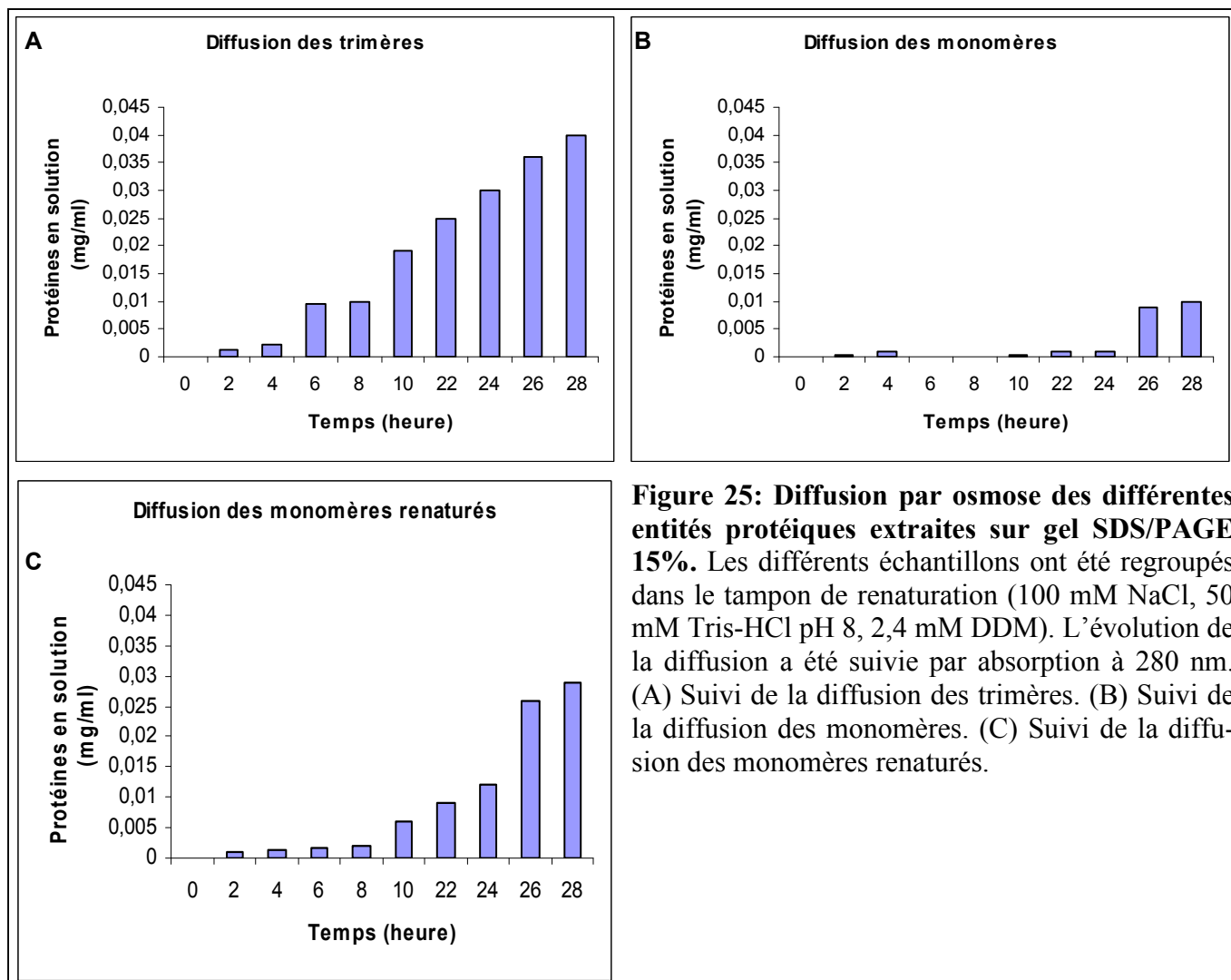




**Figure 23: Chromatographie d'exclusion.** Chromatographie d'exclusion réalisée sur Omp2a renaturée au DDM. (A) réalisation d'une droite de calibration. Passage d'étalons de poids moléculaire connus: 1- alcool déshydrogénase (ADH) (150 kDa) 2- Anhydrase carbonique (AC) (29 kDa). 3- Amylase (200 kDa) 4- Albumine (BSA) (66 kDa). En fonction des volumes d'élution, une droite de calibration est tracée à partir du logarithme de masse moléculaire (log M.W.) et du coefficient  $k = (V_e - V_o) / (V_c - V_o)$ . (B) Passage de l'échantillon d'Omp2a renaturée au DDM. Différents intervenants: 5- Correspond au volume mort de la colonne, agrégat trop volumineux que pour passer à travers les billes de la colonne. 6- Pic non identifié. 7- Trimères. 8- Monomères renaturés ou non.



**Figure 24: Omp2a renaturée via DDM - Extraction sur gel SDS/PAGE 15%.** (A) Marquage aux fluorochromes de protéines. Deux marquages ont été réalisés. « Avant » (vert) = marquage avant la renaturation de 5 jours dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 24 mM DDM à température ambiante. « Après » (rouge) = marquage après renaturation de 5 jours dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 24 mM DDM à température ambiante. Le gel a été scanné par fluorescence (dyes) ensuite coloré au nitrate d'argent pour comparaison. (B) Essai d'extraction à plus grande échelle. En rouge, étalon de poids moléculaire. En vert, Omp2a renaturée 5 jours dans 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl, 24 mM DDM à température ambiante. (C) Résultat du gel après l'étape d'extraction. Gel scanné par fluorescence. Les spots blancs correspondent à la disparition d'une partie du gel SDS/PAGE 15%. Ces morceaux ont été rassemblés en trois échantillons (correspondant aux flèches): les trimères (T), les monomères (M<sub>Dn</sub>) et les monomères renaturés (M<sub>Rn</sub>).

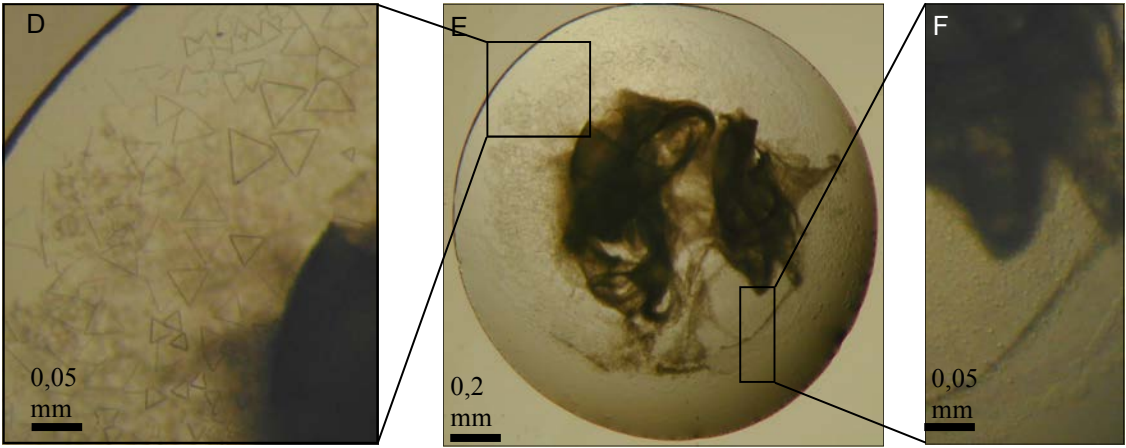
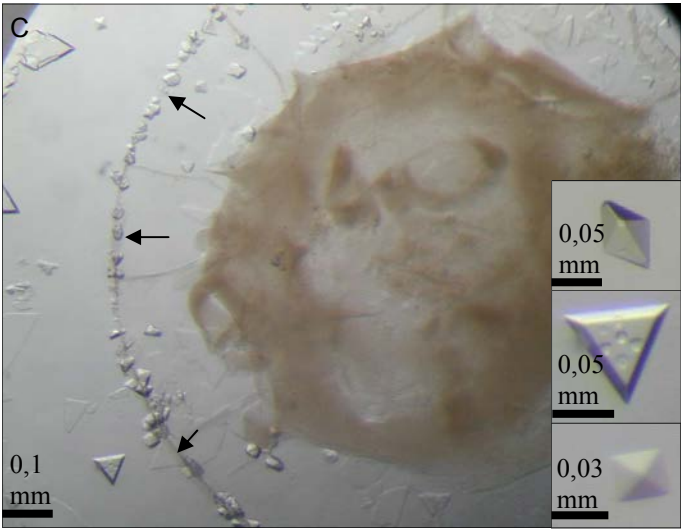


**Figure 26: Concentration de l'Omp2a renaturée (SDS-PAGE 15 % - Bleu de Coomassie (A) - Nitrate d'argent (B-C-D)).** (A) Renaturation via DDM 5 jours .1- Fraction concentrée à 25 mg/ml. (B) Renaturation d'Omp2a via SDS/MPD. 1- échantillon dénaturé. 2- échantillon renaturé. 3- résultat de concentration. (C) Changement de milieu de contention de l'Omp2a. 1- Omp2a renaturée dans 1,5 % SDS, 1,5 M MPD, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8. 2- Omp2a stockée dans 0,15 % SDS, 0,15 M MPD, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8. Conservation de l'espèce trimérique après diminution de la concentration en SDS et MPD. (D) Concentration de l'Omp2a renaturée . 1- Avant concentration. 2- Après concentration.

A		1	2	3	4	5	6
		8% PEG	10% PEG	12% PEG	14% PEG	16% PEG	18% PEG
		6000	6000	6000	6000	6000	6000
A	pH 3,5						
B	pH 4,0						
C	pH 4,5			X		X	
D	pH 5,0	X		X			X

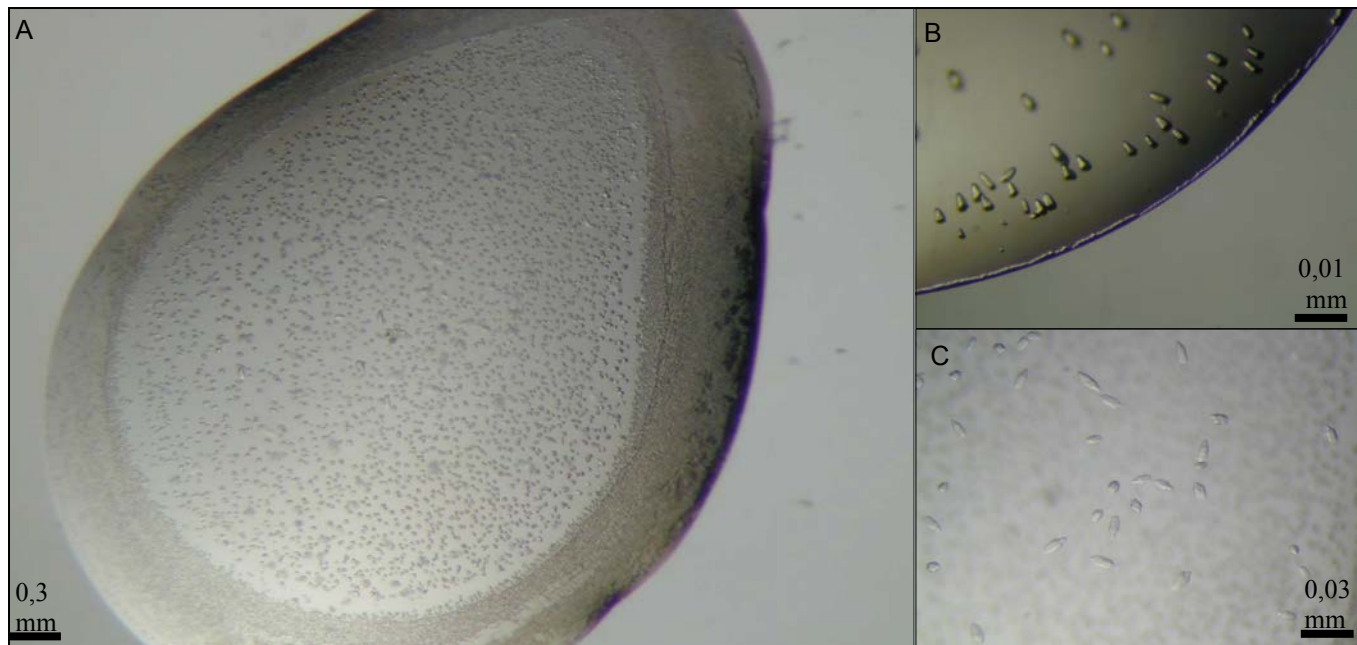
  

A	pH 5,5		X		X	X	X
B	pH 6,0			X	X	X	
C	pH 6,5						
D	pH 7,0						

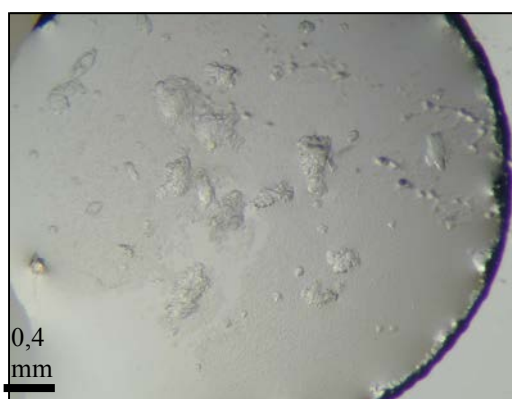


**Figure 27: Optimisation d’une condition de cristallisation d’Omp2a renaturée au DDM.** (A) et (B) Compositions de boîtes de cristallogenèse dans le but d’optimiser la condition identifiée par le kit commercial MembFac® (0,1 M NaCl, 0,1 M Acétate de sodium pH 4,6 et 12 % PEG<sub>6000</sub>). Chaque X correspond à l’apparition de cristaux. (C) Exemples de cristaux obtenus dans la condition 0,1 M NaCl, 0,1 M Acétate de Sodium pH 6,0 et 16 % PEG<sub>6000</sub>. (D) Cristaux de grande tailles (0,1 mm). (E) Goutte présentant des cristaux de tailles différentes. (F) Cristaux de petite taille (inférieure à 0,05 mm).

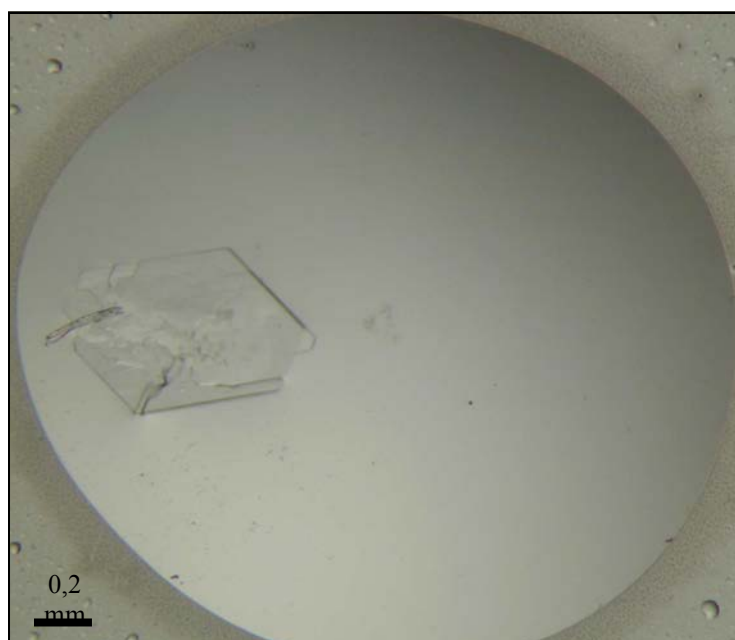




**Figure 28: Cristallisation de l'Omp2a renaturée au DDM.** Cristallisation dans 0,1 M NaCl, 0,1 M Hepès de sodium pH 7,5 et 10 % polyéthylèneglycol<sub>400</sub>. (A) Deux tailles cristallines au sein d'une même goutte. (B) Forme cristalline du bord de goutte et (C) du centre de la goutte.



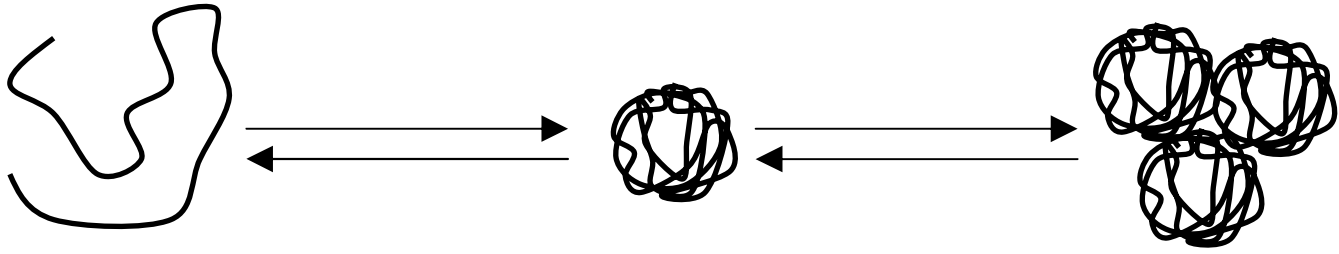
**Figure 29: Cristallisation de l'Omp2a renaturée au DDM.** Cristallisation dans 0,1 M Sulfate de Lithium, 0,1 M Citrate de Sodium pH 6 et 12 % polyéthylèneglycol<sub>6000</sub>. Les cristaux ne sont pas parfaitement formés.



**Figure 30: Cristallisation de l'Omp2a renaturée au SDS/MPD.** Cristallisation dans 0,1 M Sulfate de Lithium, 0,1 M Hepès de sodium pH 7,5 et 0,1 M Potassium tartrate tetrahydrate après 4 mois. La dimension du cristal avoisine le millimètre.







**Figure 31: Hypothèse de renaturation de l'Omp2a.** Dans un premier temps, le monomère est renaturé. Dans un second temps, trois monomères renaturés s'associent pour former l'entité trimérique.







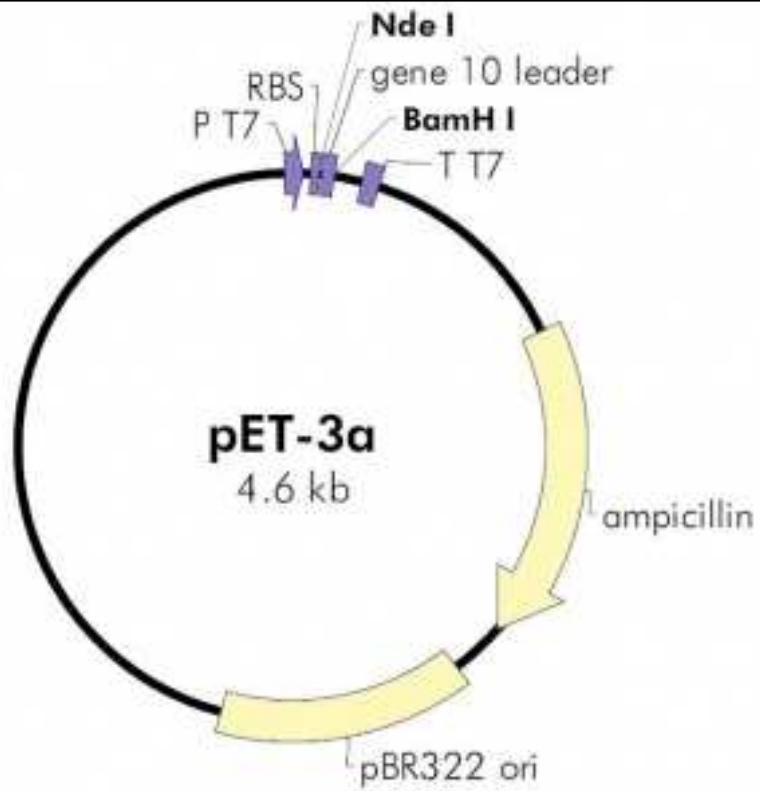
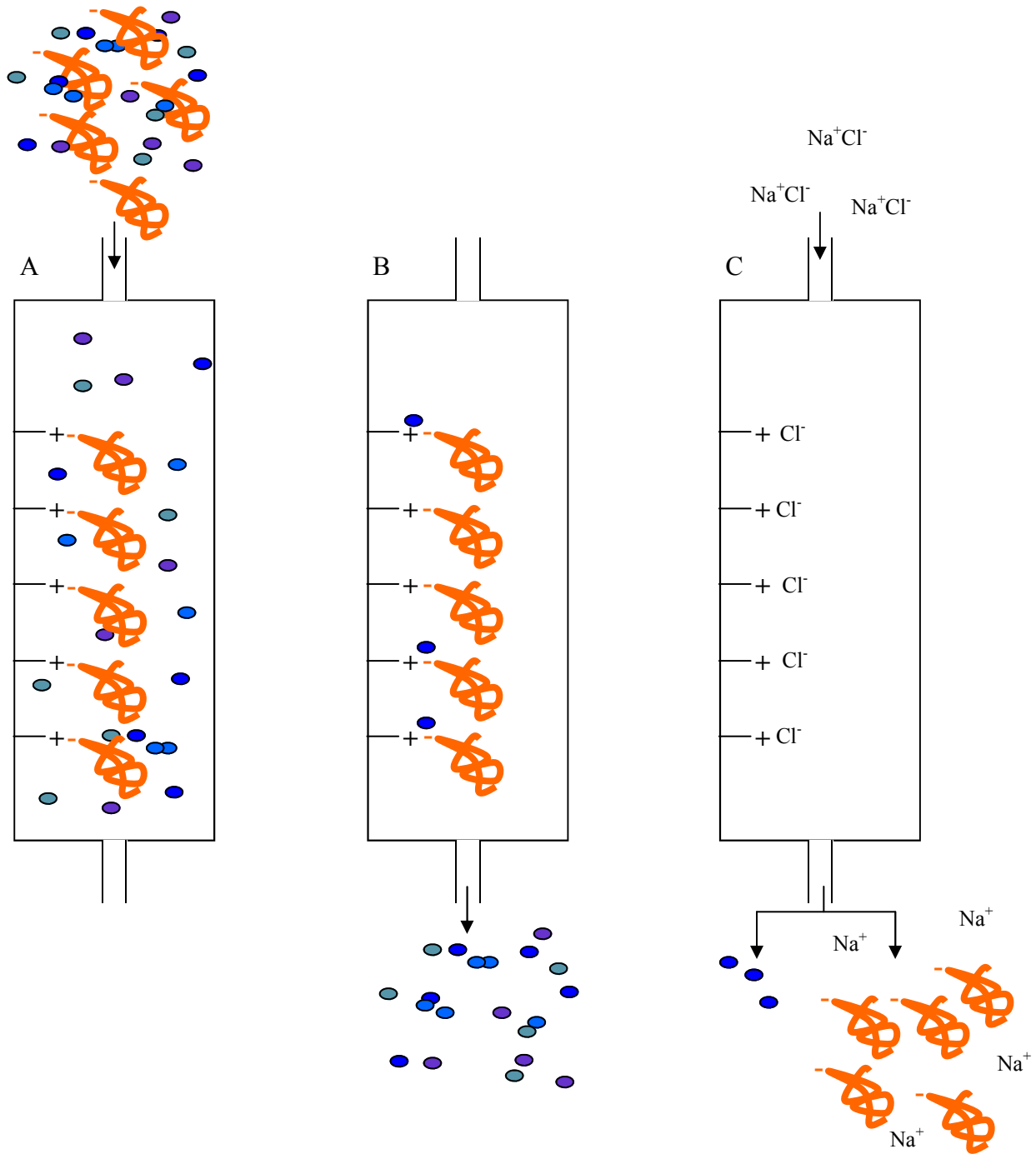


Figure 32: Cartographie du vecteur de surexpression pET3a.

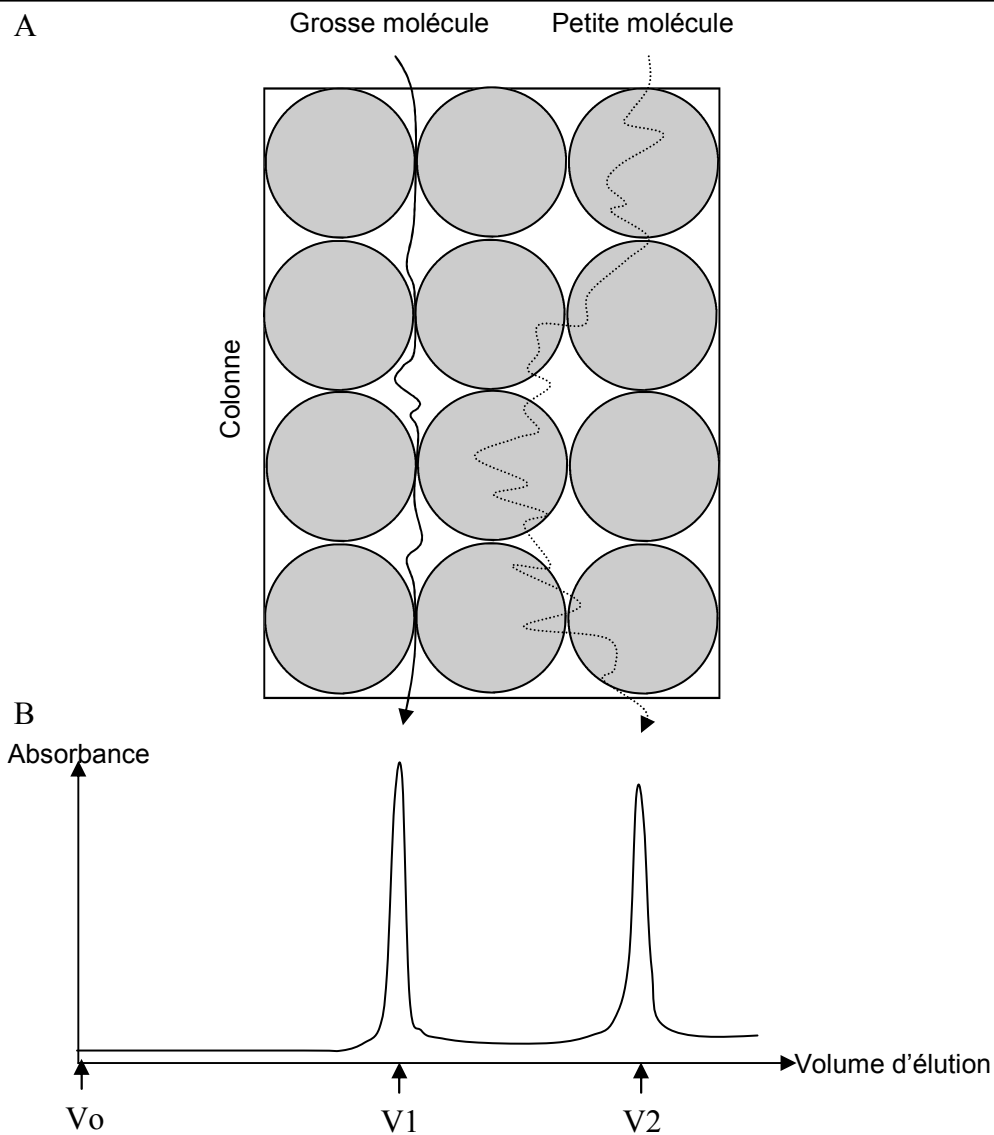


**Figure 33: Principe de la chromatographie échangeuse d'anions.** En orange, représentation de la protéine d'intérêt. En bleus, protéines contaminantes. (A) L'échantillon protéique est chargé sur la colonne de Sépharose portant des groupements chargés positivement. (B) Les protéines globalement chargées négativement s'accrochent à la colonne tandis que les protéines contaminantes sont éluées. Certaines protéines autres que la protéine d'intérêt peuvent également s'accrocher à la colonne. (C) Elution des protéines avec un gradient de NaCl. Les protéines s'éluent à différentes concentrations en NaCl en fonction de leur point isoélectrique.





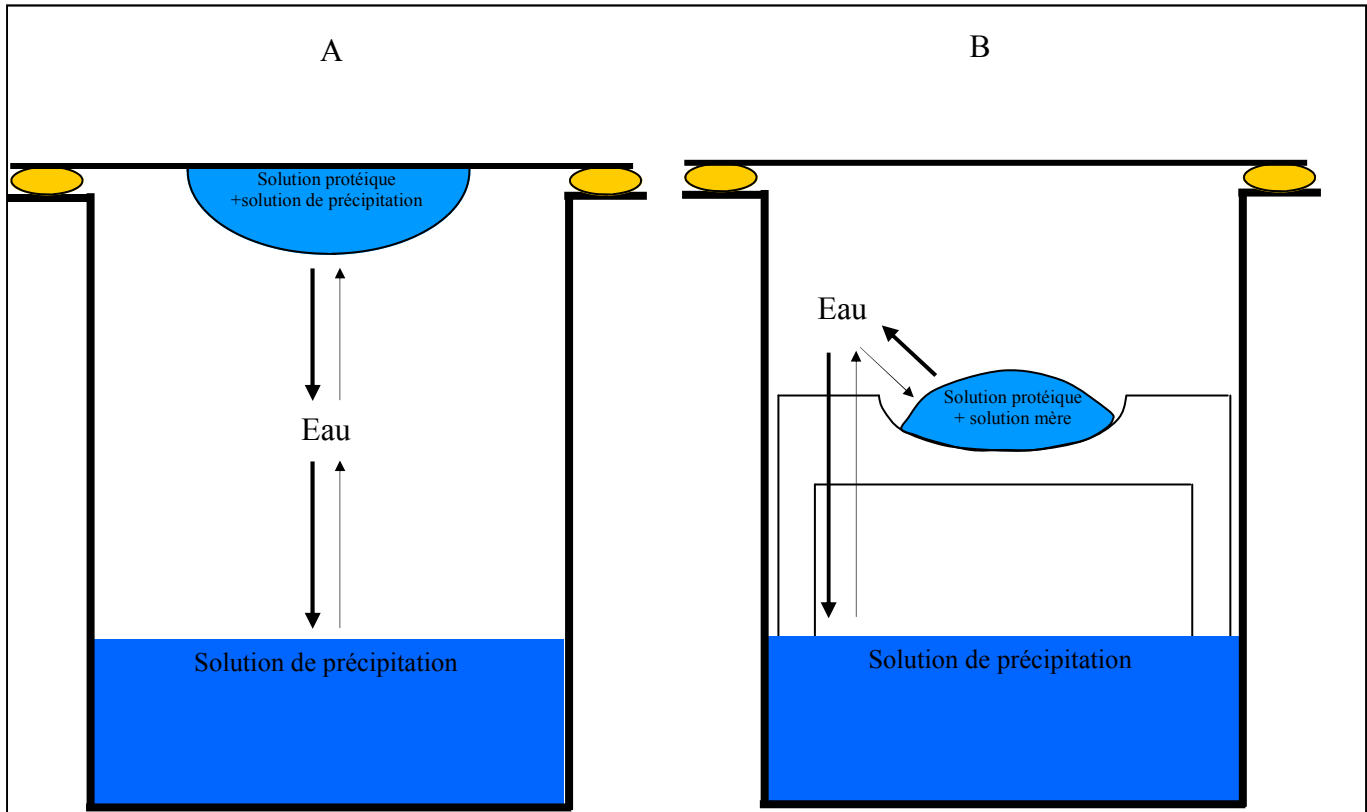




**Figure 34: Principe de la chromatographie d'exclusion.** (A) Schématisation d'une colonne. Les billes (cercles gris) sont poreuses. En fonction de la porosité, les molécules de poids moléculaires élevés ne peuvent pas pénétrer dans les billes et ont donc un trajet court. Tandis que les molécules de faible poids moléculaires peuvent pénétrer dans les billes et voient donc leur distance de parcours s'allonger considérablement. Cette différence de parcours fait que plus une molécule a un poids moléculaire élevé, plus elle passera vite à travers la colonne. (B) Représentation d'un chromatogramme d'élution. L'injection a été réalisée à  $V_0$ .  $V_1$  correspond à l'élution de protéines de poids moléculaire élevé.  $V_2$  correspond à l'élution de protéines de faibles poids moléculaire.

Adapté du manuel « GE healthcare »





**Figure 35: Technique de cristallisation.** (A) Technique de la goutte pendante. La goutte se trouve pendue sous la lame de verre. (B) Technique de la goutte assise. La goutte se trouve sur un pont. Cette technique permet de former des gouttes plus grandes.